Outils et concepts de biologie systémique pour la modélisation prédictive de la toxicité

Jérémy Hamon

▶ **To cite this version:**

Jérémy Hamon. Outils et concepts de biologie systémique pour la modélisation prédictive de la toxicité. Autre. Université de Technologie de Compiègne, 2013. Français. NNT : 2013COMP2111 . tel-00975742

HAL Id: tel-00975742

https://theses.hal.science/tel-00975742

Submitted on 9 Apr 2014

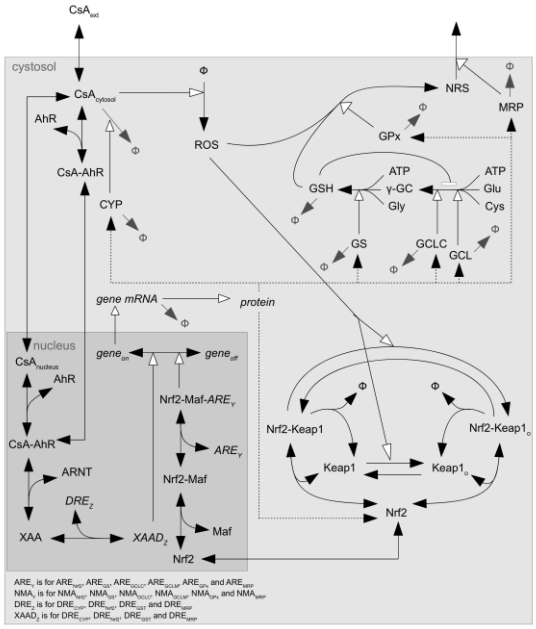
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Par **Jérémy HAMON**

Outils et concepts de biologie systémique pour la modélisation prédictive de la toxicité

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'UTC



Soutenue le 21 novembre 2013
Spécialité : Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

D2111

UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

ECOLE DOCTORALE - « SCIENCES POUR L'INGENIEUR »

Doctorat

Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

Jérémy Hamon

Outils et concepts de biologie systémique pour la modélisation prédictive de la toxicité

Thèse dirigée par Frédéric Y. Bois

Soutenue le 21 novembre 2013

Membres du jury :

Rapporteurs :

- Lysiane Richert (Université de Franche-Comté)
- Xavier Declèves (Université Paris Descartes)

Examinateurs :

- Cécile Legallais (Université de Technologie de Compiègne)
- Frédéric Y. Bois (Université de Technologie de Compiègne)
- Jacques Richard (Sanofi)

Remerciements

Je remercie Marie-Christine HO BA THO, Cécile LEGALLAIS et Jean-François LERALLUT de m'avoir accueilli au sein de l'unité de recherche BMBI (BioMécanique et BioIngénierie) et au sein du département Génie Biologique à l'UTC et Alexandre PERY de m'avoir accueilli au sein de l'unité METO (Modèles pour l'Écotoxicologie et la Toxicologie) à l'INERIS.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, Frédéric BOIS, qui m'a encadré durant ces trois ans de thèse. Il a su me former tout en me laissant une certaine autonomie afin d'explorer diverses voies et faire ma propre expérience. Je suis reconnaissant de sa compréhension et de la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie Lysiane RICHERT et Xavier DECLEVES d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse, ainsi que Cécile LEGALLAIS et Jacques RICHARD d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie tous ceux que j'ai côtoyés à l'UTC et à l'INERIS pendant ces trois ans pour l'aide qu'ils m'ont apportée, et/ou tout simplement pour leur gentillesse et leur bonne humeur : Laurence ALEGRIA, Catherine LACOURT, Frédérique ROSE, Myriam SAWEZYN, Odile LECLERC, Alain LE VERGER, Catherine MARQUE, Eric LECLERC, Anne-Virginie SALSAC, Patrick PAULLIER, Murielle DUFRESNE, Muriel VAYSSADE, Jean-Luc DUVAL, Pascale VIGNERON, Christophe EGLES, Audrey DRELICH, Christella LEQUEUX, Claude DELAVIERE, Quentin DERMIGNY, Richard GOUMBA, Adeline GUELLIER, Anne LE GOFF, Céline BROCHOT, Florence ZEMAN, Cléo TEBBY, Rémy BEAUDOIN, et Enrico MOMBELLI.

De même, un grand merci à Iolanda, Mathias, Maya, Maï, Jean-Matthieu, Régis, Xu Qu, Marie-Charlotte, Leïla, Marie B., Stéphanie, Giulia, Luis, Estelle, Amira, Glwadys Audrey L., Tommaso, Ilaria, Pierre, Ulysse, Pierre-Yves, Perrine, Rachid, Kamelia, Nadia, Goulwen, Benoit et Edeline, et bon courage à Marie N., Claire, Thibault, Timothée, Benjamin, Vittoria, Sarah, Justine, Fabien, Marie-Emilie et Sophie.

Je remercie mes parents et mon frère de m'avoir soutenu pendant ces trois années et de m'avoir aidé pour les corrections du manuscrit (même si après moult relectures, des phautes :-) subsistent). Je remercie Sandrine d'être à mes côtés tous les jours :-) et de m'avoir supporté, ou plutôt d'avoir supporté mon stress pendant ces dernières semaines.

Et enfin, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont participé et soutenu ce travail, tous ceux qui m'ont aidé ou que j'ai brièvement côtoyé et que j'ai malheureusement oublié de citer.

Résumé

Le besoin actuel de comprendre les conséquences précises que l'administration d'une molécule va avoir sur un organisme et les organes qui le composent, est un enjeu majeur pour la recherche pharmaceutique et l'étude de la toxicité des xénobiotiques. Il n'est pas difficile de se rendre compte, quand les effets sont observables, qu'il existe un lien entre la dose administrée d'un xénobiotique et ses effets. La difficulté de les prédire, qu'ils soient bénéfiques ou délétères, réside principalement dans le fait qu'un nombre très important de mécanismes complexes sont mis en jeu, dès l'entrée de cette molécule dans l'organisme et jusqu'à son excrétion. Afin de comprendre et quantifier ce lien, et pour pouvoir faire des prédictions, il est nécessaire de connaître les principaux mécanismes biologiques impliqués et il est possible de proposer des modèles mathématiques les décrivant.

La pharmacocinétique, la pharmacodynamie et la biologie systémique sont les domaines d'étude qui permettent de répondre le mieux à ce dernier besoin. La première étudie le "devenir des xénobiotiques" dans l'organisme et la seconde, l'évolution de leurs effets. La biologie systémique (SB) est une démarche relativement nouvelle qui consiste à coupler différents niveaux d'informations (données expérimentales, connaissances chimiques et biologiques, hypothèses, ...) à l'aide de modèles mathématiques afin de comprendre comment fonctionnent des systèmes biologiques complexes.

Certaines hypothèses concernant les mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité de la cyclosporine A (CsA) font actuellement l'objet de recherches : Elle est connue pour induire un stress oxydant au niveau mitochondrial, et l'administration conjointe de CsA et d'anti-oxydants semble atténuer sa néphrotoxicité. Nous avons ici étudié le lien entre l'administration systémique de CsA et la production d'espèces réactives de l'oxygène, en incluant leur contrôle par la voie de signalisation Nrf2. Nous avons modélisé avec succès la production d'espèces réactive de l'oxygène par la CsA et nous présentons des extrapolations *in vitro* - *in vivo* de ces effets, à l'aide d'un modèle pharmacocinétique physiologique.

Le travail présenté dans cette thèse montre que l'utilisation de la biologie systémique n'est pas facile et manque encore de maturité. Au delà de la diversité des connaissances auxquelles elle fait appel, on se rend compte que la quantité de données et de paramètres à gérer est considérable. Pour un modèle ne prenant en compte qu'une seule voie de signalisation, comme celui présenté ici, plusieurs mois ont été nécessaires pour sa calibration. Cette durée est en grande partie imputable aux temps de calculs nécessaires aux estimations des paramètres, et au temps nécessaire à la récolte et aux traitements des données très diverses (données PK, omiques, physiologiques, cellulaires, *etc.*) Il est très important que le protocole de collecte des données soit défini en commun par l'ensemble des équipes les utilisant par la suite.

Mots clefs : Pharmacocinétique, biologie systémique, toxicologie prédictive, modélisation mathématique.

Abstract

Title: Systems biology tools and concepts for predictive modelling of toxicity.

The current need to understand the consequences of the administration of a specific molecule to a given organism is a major issue for pharmaceutical and toxicological research. It is not difficult to realize, when the effects are observable, that there is a relationship between the dose of a xenobiotic and its effects. The difficulty in predicting such effects, whether beneficial or harmful, comes mainly from the fact that a large number of complex mechanisms are involved, from the entry of the molecule in the body to its excretion. To understand and quantify this relationship, and to be able to make predictions, it is necessary to know the main biological mechanisms involved and it is possible to propose corresponding mathematical models.

Pharmacokinetics, pharmacodynamics and systems biology are the scientific fields most appropriate to meet this need. The first examines the fate of xenobiotics in the body and the second, the evolution of their effects. They involve many disciplines such as mathematics, analytical chemistry, biochemistry, pharmacology, physiology, and toxicology. Systems biology is a relatively new approach which combines different levels of information (experimental data, chemical and biological knowledge, assumptions, ...) with mathematical models to understand how complex biological systems work.

Some assumptions about the mechanisms involved in the nephrotoxicity of cyclosporine A are currently being investigated: It is known to induce oxidative stress at the mitochondrial level, and co-administration of cyclosporine A and anti-oxidants seems to mitigate its nephrotoxicity. We study here the link between cyclosporine A administration and reactive oxygen species production and control by the NFE2L2 signaling pathway. We successfully modeled the production of reactive oxygen species by cyclosporine A and were make *in vitro* to *in vivo* predictions of these effects, via physiologically based pharmacokinetic modeling.

Our work shows that the use of systems biology is not easy and still lacks maturity. The amount of data and parameters to manage is typically huge. For a model taking into account only one signaling pathway, several months were needed for its calibration. This length of time is largely due to computation time required for parameter estimates, but also to the time required for harvesting and processing of diverse data (PK data omics, physiological, cellular, *etc*.) It is important that data collection protocol be defined in common by all the teams involved.

Key words: Pharmacokinetics, systems biology, predictive toxicology, mathematical modelling.

Abréviations

AhR : Récepteur des hydrocarbures aromatiques.

ARE (pour antioxidant response element) : Séquence ADN spécifque pouvant induire la transcription de gènes.

ARNm : Acide ribonucléique messager.

ARNT : Translocateur nucléaire du récepteur des hydrocarbures aromatiques.

CsA : Cyclosporine A.

$CsA_{cytosol}$: Quantité de cyclosporine A cytosolique.

$CsA_{extracellular}$: Quantité de cyclosporine A extracellulaire.

CsA_{wall} : Quantité de cyclosporine A adsorbée sur les parois des puits.

CYP : Cytochrome P450.

DRE (pour dioxine response element) : Séquence ADN spécifque pouvant induire la transcription de gènes.

GCL : Glutamate cystéine ligase.

GCLC : Sous-unité catalytique de la glutamate cystéine ligase.

GCLM : Sous-unité régulatrice de la glutamate cystéine ligase.

GPx : Glutathion peroxydase.

GS : Glutathion synthétase.

GSH : Forme réduite du glutathion.

GSSG : Forme oxydée du glutathion.

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1.

MCMC : Méthode de Monte-Carlo par chaînes de Markov.

MTX : Métabolomique.

Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2.

NMA : Complexe formé par l'association de Nrf2, Maf et ARE

NRS : Espèces non réactives.

PK : Pharmacocinétique.

PTX : Protéomique.

ROS : Espèces réactives de l'oxygène.

RPTEC : Cellules (rénales) épithéliales du tubule proximal.

TCX : Transcriptomique.

XAA : Complexe formé par l'association de CsA, AhR et ARNT.

XAAD : Complexe formé par l'association de XAA (CsA-AhR-ARNT) et DRE.

γ-GC : γ-glutamylcystéine.

Table des matières

Liste des figures....8
Liste des tableaux....16
1. Introduction....17
2. Rappels scientifiques....21
2.1. Extrapolation quantitative in vitro in vivo (QIVIVE)....21
2.2. Pharmacocinétique....25
2.2.1. Exemple de modèle pharmacocinétique simple : modèle monocompartimental d'un bolus intraveineux....27
2.2.2. Modèles physiologiques (PBPK)....29
2.2.2.1. Construction d'un modèle PBPK....30
Principes de bases et équations....30
Paramètres et variabilité....34
Résolution des équations....35
2.2.2.2. Utilisation des modèles PBPK....36
2.2.2.3. Perspectives concernant les modèles PBPK....37
2.3. Biologie systémique....39
2.4. La voie de signalisation Nrf2....42
2.5. Méthodes statistiques bayésiennes pour la calibration de modèles complexes....45
2.6. Le projet européen PREDICT-IV....47
3. Matériel et méthodes....50
3.1. Données....50
3.1.1. Données survie cellulaire....50
3.1.2. Données PK vitro....50
3.2. Modèles....52
3.2.1. Modèle de PK in vitro....52
3.2.2. Modèle Nrf2....53
3.2.3. Modèle PBPK pour la CsA....55
3.3. Méthodes statistiques....59
4. Résultats....62

4.1. Modèle PK in vitro..... 62
4.2. Modèle PKSB (couplage du modèle PK in vitro et d'un modèle Nrf2).....67
4.3. Modèle PBPK..... 122
4.4. Modèle « PBPK-SB » (couplage du modèle PBPK avec le modèle PKSB).....127
5. Discussion.....139
6. Conclusions et Perspectives..... 146
Références bibliographiques..... 148
Annexes..... 153

Liste des figures

Figure 1 : Présentation schématique des différentes étapes suivies au cours de ma thèse. 20

Figure 2 : Les principales composantes et étapes de l'extrapolation quantitative in vitro-in vivo et de la prédiction de la toxicité. Les prédictions (en violet) de PK in vitro, de PK au niveau de l'organisme, des effets cellulaires et des effets sur l'organisme, sont réalisées à partir de plusieurs types de modèles (en vert). Ces modèles doivent être en mesure d'intégrer des données (en rouge-orangé) provenant de diverses sources. 24

Figure 3 : Représentation schématique d'un modèle PBPK simple. 31

Figure 4 : Vue schématique et simplifiée de la voie de signalisation impliquant Nrf2 (d'après Kim et al. [1]) 44

Figure 5 : Principe de la calibration bayésienne (d'après Micallef et al. [2]). 47

Figure 6 : Vue schématique du protocole utilisé pour les prélèvements des omiques, et de la CsA extracellulaire, intracellulaire, et adsorbée (d'après Wilmes et al. [3]). 51

Figure 7 : Représentation schématique du modèle de PK in vitro. 52

Figure 8 : Représentation schématique du modèle de biologie systémique Nrf2. 55

Figure 9 : Représentation schématique du modèle PBPK utilisé par Simcyp. 56

Figure 10 : Prédictions et données de la concentration en CsA dans le sang. Les données, provenant de Gupta et al. [4], ont été obtenues après une administration orale de 10 mg/kg de CsA , et sont représentées par des carrés pour les sujets ayant reçu un régime appauvri en matières grasses, et des triangles pour les sujets ayant reçu un régime enrichi en matières grasses. La ligne pleine correspond à la prédiction moyenne pour 100 sujets (alimentation non prise en compte) et les lignes en pointillés correspondent au 5ème et 95ème centiles des prédictions (d'après Bois et al. [5]). 57

Figure 11 : Prédictions moyennes des concentrations de CsA dans le foie, le rein et le SNC (d'après Bois et al. [5]) 58

Figure 12 : Présentation schématique des différentes étapes de la partie concernant le modèle PK in vitro (Partie 1) 62

Figure 13 : Représentation graphique des quantités extracellulaires (A1 et A2), intracellulaires (B1 et B2) et adsorbées (C1 et C2) en CsA en fonction du temps (sur 14 jours). Les résultats obtenus pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM sont représentés en haut (A1, B1 et C1), et les résultats obtenus pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM sont représentés en bas (A2, B2 et C2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. Les cercles rouges représentent les données 64

Figure 14 : Représentation graphique des quantités extracellulaires (A1 et A2), intracellulaires (B1 et B2) et adsorbées (C1 et C2) en CsA en fonction du temps (sur 60 jours). Les résultats obtenus pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM sont représentés en bas (A2, B2 et C2), et les résultats obtenus pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM sont représentés en haut (A1, B1 et C1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. 65

Figure 15 : Présentation schématique des différentes étapes de la partie concernant le modèle PKSB (Partie 2) 67

Figure 16a : Distributions des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions (en noir) et pour le second ensemble de solutions (en rouge). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution a priori. . 70

Figure 16b : Distributions des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions (en noir) et pour le second ensemble de solutions (en rouge). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution a priori. . 71

Figure 16c : Distributions des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions (en noir) et pour le second ensemble de solutions (en rouge). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution a priori. . 72

Figure 17 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. Les cercles rouges représentent les données. 74

Figure 18 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. Les cercles rouges représentent les données. 75

Figure 19 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. 78

Figure 20 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM . Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....79

Figure 21 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et sans administration de CsA. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....81

Figure 22 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....82

Figure 23 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....83

Figure 24a : Distributions a posteriori des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution a priori.....84

Figure 24b : Distributions a posteriori des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution a priori.....85

Figure 24c : Distributions a posteriori des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution a priori.....86

Figure 25 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 14 jours), pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A2 et B2), et sans administration de CsA (A1 et B1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....88

Figure 26 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 14 jours), pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A1 et B1), et à 15 µM (A2 et B2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. Les courbes rouges représentent les mêmes prédictions que les courbes noires et bleue, mais avec une échelle logarithmique pour l'axe des ordonnées.....89

Figure 27 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 60 jours), pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A2 et B2), et sans administration de CsA (A1 et B1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....90

Figure 28 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 60 jours), pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A1 et B1), et à 15 µM (A2 et B2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. Les courbes rouges représentent les mêmes prédictions que les courbes noires et bleue, mais avec une échelle logarithmique pour l'axe des ordonnées.....91

Figure 29 : Représentation graphique des quantités intracellulairse des ROS, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du PES et ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....93

Figure 30 : Représentation graphique des quantités intranucléaires de Nrf2, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du PES et ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....94

Figure 31 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de GSH, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du PES et ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....95

Figure 32 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de γ-GC, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du PES et ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....96

Figure 33 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. Les cercles rouges représentent les données.....98

Figure 34 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. Les cercles rouges représentent les données.....99

Figure 35 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....100

Figure 36 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....101

Figure 37 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et sans administration de CsA. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....103

Figure 38 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....104

Figure 39 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM . Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....105

Figure 40a : Distributions a posteriori des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le second ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution a priori.....106

Figure 40b : Distributions a posteriori des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le second ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution a priori.....107

Figure 40c : Distributions a posteriori des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le second ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution a priori.....108

Figure 41 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A2 et B2), et sans administration de CsA (A1 et B1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....110

Figure 42 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A1 et B1), et 15 µM (A2 et B2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le SES. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du SES, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori.....111

Figure 43 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A2 et B2), et sans administration de CsA (A1 et B1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le SES. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du SES, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. 112

Figure 44 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A1 et B1), et 15 µM (A2 et B2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le SES. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du SES, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. 113

Figure 45 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. 115

Figure 46 : Représentation graphique des quantités intranucléaires de Nrf2, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. 116

Figure 47 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de GS, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. 117

Figure 48 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de GSH, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. 118

Figure 49 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de γ-GC, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité a posteriori. 119

Figure 50 : Présentation schématique des différentes étapes de la partie concernant le modèle PBPK 122

Figure 51 : Prédictions des concentrations en CsA dans le plasma (B) et dans le liquide extracellulaire rénale (C), et des concentrations et quantités de CsA dans les cellules rénales (A), pour 100 sujets, pour une administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, et en utilisant la valeur de la clairance in vivo. Les lignes pleines correspondent à la prédiction moyenne pour les 100 sujets et les lignes en pointillés correspondent au 5ème et 95ème centiles des prédictions (uniquement pour les concentrations/quantités intracellulaires rénales). 124

Figure 52 : Prédictions des concentrations en CsA dans le plasma (B) et dans le liquide extracellulaire rénale (C), et des concentrations et quantités de CsA dans les cellules rénales (A), pour 100 sujets, pour une administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, et en utilisant la valeur de la clairance in vitro. Les lignes pleines correspondent à la prédiction moyenne pour les 100 sujets et les lignes en pointillés correspondent au 5ème et 95ème centiles des prédictions (uniquement pour les concentrations/quantités intracellulaires rénales). 125

Figure 53 : Présentation schématique des différentes étapes de la partie concernant le couplage PBPK-SB (Partie 4) 127

Figure 54 : Prédictions des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant la valeur de la clairance in vivo, et en utilisant le PES. 129

Figure 55 : Prédictions des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant la valeur de la clairance in vitro, et en utilisant le PES. 130

Figure 56 : Prédictions (échelles semi-logarithmiques) des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant la valeur de la clairance in vivo, et en utilisant le SES 131

Figure 57 : Prédictions des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant la valeur de la clairance in vitro, et en utilisant le PES. 132

Figure 58 : Distributions des maximums des quantités intracellulaires de CsA (nmol), des ROS (nmol), de GS (zmol), de GSH (zmol), de γ-GC (zmol) et intranucléaires de Nrf2 (zmol) pour 10000 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA sur 60 jours, en utilisant la valeur de la clairance in vitro, et en utilisant le PES. 134

Figure 59 : Distributions des maximums des quantités intracellulaires de CsA (nmol), des ROS (nmol), de GS (zmol), de GSH (zmol), de γ-GC (zmol) et intranucléaires de Nrf2 (zmol) pour 10000 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA sur 60 jours, en utilisant la valeur de la clairance in vitro, et en utilisant le SES. 135

Figure 60 : Distributions des maximums des quantités intracellulaires de CsA (nmol), des ROS (nmol), de GS (zmol), de GSH (zmol), de γ-GC (zmol) et intranucléaires de Nrf2 (zmol) pour 10000 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA sur 60 jours, en utilisant la valeur de la clairance in vivo, et en utilisant le PES. 136

Figure 61 : Distributions des maximums des quantités intracellulaires de CsA (nmol), des ROS (nmol), de GS (zmol), de GSH (zmol), de γ-GC (zmol) et intranucléaires de Nrf2 (zmol) pour 10000 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA sur 60 jours, en utilisant la valeur de la clairance in vivo, et en utilisant le SES. 137

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux logiciels utilisés en PBPK..... 36
Tableau 2 : Liste des organismes participant au projet européen PREDICT-IV.....49
Tableau 3 : Liste des paramètres calibrés du modèle PKSB, et de leur distribution a priori.....61
Tableau 4 : Liste des paramètres du modèle PK in vitro, et de leurs distributions statistiques.....66
Tableau 5 : Liste des paramètres calibrés du modèle PKSB, et de leur distribution a posteriori.....68

1. Introduction

Le besoin actuel de comprendre les conséquences précises qu'une molécule, une fois administrée, va avoir sur un organisme et les organes qui le composent, est un enjeu majeur pour la recherche pharmaceutique et l'étude de la toxicité des xénobiotiques. Il n'est pas difficile de se rendre compte, quand les effets sont observables, qu'il existe un lien entre la dose administrée d'un xénobiotique et ses effets. La difficulté de les estimer, qu'ils soient bénéfiques ou délétères, réside principalement dans le fait qu'un nombre très important de mécanismes divers et complexes sont mis en jeu, dès l'entrée de cette molécule dans l'organisme et jusqu'à son élimination. Afin de comprendre et quantifier ce lien, et pour pouvoir faire des prédictions, il est nécessaire de connaître les principaux mécanismes biologiques impliqués et de proposer des modèles mathématiques les décrivant.

La pharmacocinétique et la pharmacodynamie sont les domaines d'étude qui permettent de répondre le mieux à ce besoin. La première étudie le "devenir des xénobiotiques" dans l'organisme et la seconde, l'évolution de leurs effets. Elles font appel à de nombreuses disciplines comme les mathématiques, la chimie analytique, la biochimie, la pharmacologie, la physiologie, ou la toxicologie. Leur pluridisciplinarité est un atout majeur pour l'étude intégrative des mécanismes biologiques.

Une des principales motivations qui poussent la communauté scientifique à améliorer les modèles mathématiques utilisés en « cinétique » et « dynamie », est de pouvoir, à terme, prédire de manière efficace toutes les conséquences que pourraient avoir l'administration ou la carence d'une substance donnée ou d'un mélange défini de substances sur une personne donnée. Il serait ainsi possible de définir plus précisément les dosages thérapeutiques efficaces sans être toxiques, et ceci le plus tôt possible dans le développement des substances médicamenteuses. On pourrait aussi déterminer d'une façon plus précise les risques pour la santé associés aux carences en nutriments ou aux expositions aux substances chimiques. Cette avancée présente un intérêt évident dans l'amélioration de notre qualité de vie. De plus, elle permettrait également de diminuer le nombre et le coût des essais cliniques et surtout de diminuer, voire supprimer, les expérimentations animales qui seraient remplacées par une triade - modèles mathématiques - études *in vitro* - études cliniques ou épidémiologiques - plus intégrée et performante qu'actuellement.

Les modèles de pharmacocinétique permettent de décrire la biodistribution d'une substance (c'est-à-dire son absorption, sa distribution, et son élimination) au sein d'un organisme. Les modèles les plus simples représentent l'organisme comme un, deux, voire trois compartiments. La volonté actuelle de définir avec précision le devenir des xénobiotiques dans l'organisme est difficilement compatible avec l'utilisation de ces modèles simples. Depuis plusieurs années, des modèles plus évolués sont utilisés, principalement dans le but d'améliorer la prédiction mais aussi afin de prendre en considération, de manière plus attentive, les mécanismes biologiques connus qui jouent un rôle important dans la biodistribution des xénobiotiques dans l'organisme. Ces modèles sont appelés « modèles pharmacocinétiques physiologiques » (ou modèles PBPK pour « Physiologically Based PharmacoKinetic »).

Ils représentent l'organisme étudié (humain, rat, souris, etc...) par de nombreux compartiments correspondant chacun à un organe, ou à un groupe d'organes dans certains cas. L'avantage des modèles PBPK est d'offrir une description des conditions physiologiques plus fidèle que celle des modèles empiriques, ce qui permet, entre autres, d'obtenir de meilleures prédictions du comportement biologique. Dans les modèles PBPK, des données physiologiques, comme les volumes des organes et les flux sanguins, sont nécessairement prises en compte, ainsi que les caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées. Ces propriétés sont très souvent corrélées aux différentes grandeurs caractéristiques de la distribution, de l'absorption et de l'excrétion d'une molécule (par exemple *pKa* pour l'absorption, la lipophilie pour la distribution, le poids moléculaire pour la filtration glomérulaire, etc...) et permettent d'affiner de façon non négligeable les modèles existants. La tendance actuelle est de détailler de plus en plus ces modèles PBPK afin de se rapprocher au maximum des conditions réelles décrivant le parcours d'une molécule dans l'organisme, tout en les rendant génériques afin d'étendre leur utilisation au plus grand nombre de molécules possible.

Un autre domaine, plus récent, permet lui-aussi d'étudier et modéliser les mécanismes biologiques présents dans les organismes vivants. Ce domaine est la biologie systémique. La biologie systémique (SB) est une démarche nouvelle qui consiste à coupler différents niveaux d'informations (données expérimentales, connaissances chimiques et biologiques, hypothèses, ...) avec des modèles mathématiques afin de comprendre comment fonctionnent des systèmes biologiques complexes. En effet, l'étude des relations et des interactions existant entre les différentes parties d'un système biologique peut permettre de découvrir et surtout d'approfondir les connaissances du mode de fonctionnement de la totalité de ce système.

Le sujet de la thèse que je défends s'articule principalement autour de l'utilisation de la biologie systémique (SB) dans un modèle de pharmacocinétique (PK), et mon but est de prouver l'utilité et l'intérêt de ce couplage « PKSB » (Figure 1).

Toutes les expérimentations et modèles présentés par la suite ont été réalisés avec, comme molécule de référence, la cyclosporine A (CsA). La CsA appartient au groupe des médicaments appelés immunosuppresseurs et plus spécifiquement aux inhibiteurs de la calcineurine. Elle s'utilise pour prévenir le rejet du greffon suite à une transplantation d'organe ou une greffe de moelle osseuse en supprimant la défense naturelle de l'organisme, le système immunitaire. Elle s'utilise également dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et dans certains cas de psoriasis sévères.

Actuellement, le mode d'action de la CsA n'est pas parfaitement connu. Il est admis que la CsA possède une affinité pour les lymphocytes, et plus particulièrement pour les lymphocytes T. Le ligand de la CsA, responsable de cette affinité, est une protéine cytosolique appartenant à la famille des cyclophilines. Le complexe CsA-cyclophiline inhibe la calcineurine, protéine phosphatase, qui dans des circonstances normales active la transcription du gène de l'interleukine 2. Il inhibe également la production de lymphokine et la libération d'interleukines, conduisant à une réduction d'activité des lymphocytes T. Les effets indésirables les plus documentés de la CsA sont la néphrotoxicité et les maladies opportunistes qui résultent de l'immunosuppression. La néphrotoxicité de la CsA est due à des dommages causés au niveau du tube contourné proximal et au niveau du système vasculaire rénal [6,7]. Certaines hypothèses concernant les mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité de la CsA font actuellement l'objet de recherches [8]: la CsA est connue pour induire le stress oxydant au niveau mitochondrial, et l’administration conjointe de CsA et d'anti-oxydant semble atténuer la néphrotoxicité de la CsA [9].

Nous avons donc, pour notre part, étudié le lien entre l'administration systémique de CsA et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour « reactive oxygen species »).

Dans un premier temps, afin de comprendre les mécanismes de distribution de la CsA dans des cellules rénales proximales (RPTEC), un modèle de distribution *in vitro («* modèle PK *in vitro* ») a été développé. Grâce à ce modèle, l'accumulation de la CsA dans les cellules rénales proximales a pu être précisément quantifiée. Dans un second temps, un modèle de biologie systémique, reprenant certaines voies de signalisation impliquant le gène Nrf2, a été utilisé et optimisé afin de le confronter à des données transcriptomiques (TCX), protéomiques (PTX) et métabolomiques (MTX), obtenues là-aussi après culture de cellules rénales proximales et exposition

de ces dernières à la CsA. Afin de relier la quantité intracellulaire de CsA et la réponse du réseau Nrf2 suivant l'administration de CsA, et de définir les mécanismes impliqués dans ce lien, le modèle de distribution *in vitro* et le modèle de biologie systémique ont été couplés en un unique modèle, appelé modèle PKSB.

Enfin, une fois calibré à l'aide des données obtenues *in vitro*, le modèle de biologie systémique a été couplé à un modèle PBPK et ce, dans l'intention de tester sa fiabilité face à des données *in vivo*.

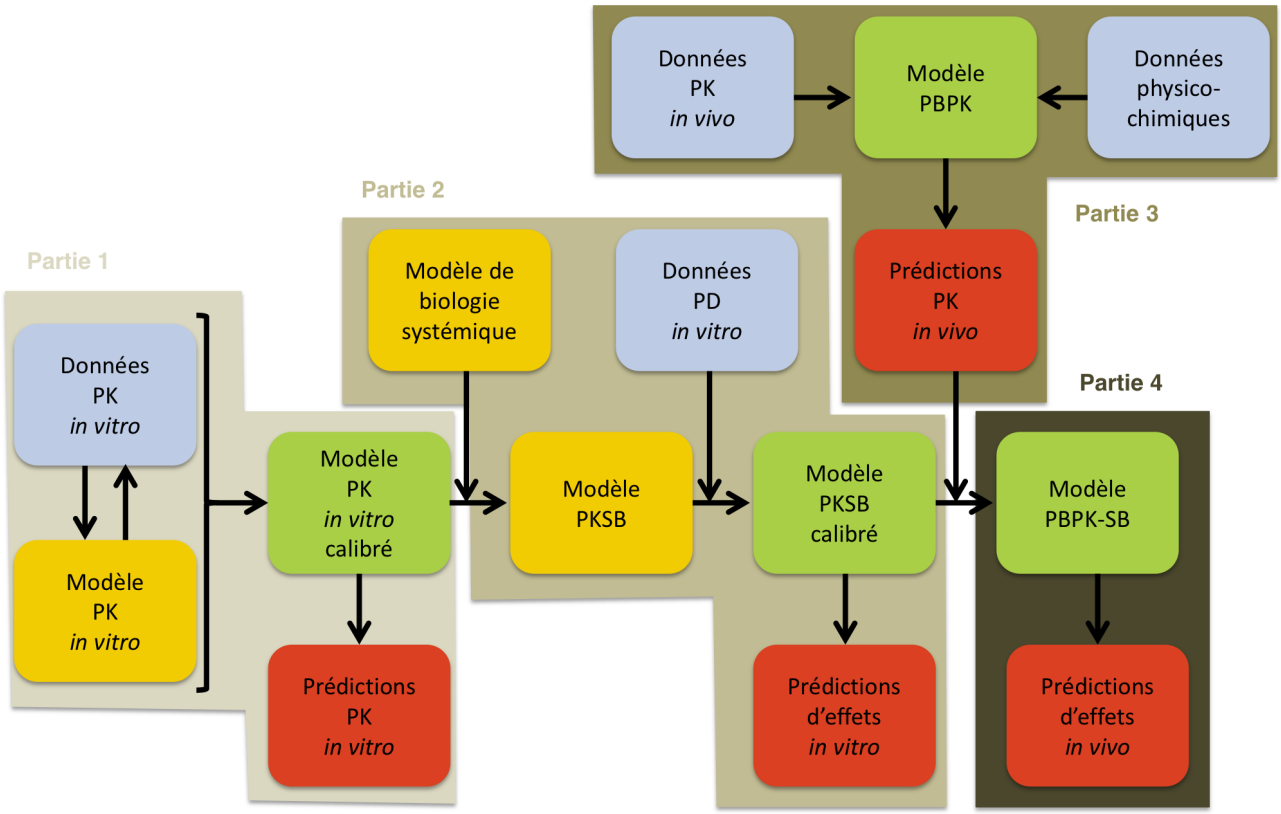


Figure 1 : Présentation schématique des différentes étapes suivies au cours de ma thèse.

2. Rappels scientifiques

2.1. Extrapolation quantitative in vitro in vivo (QIVIVE)

Les contraintes économiques, les avancées scientifiques ainsi que l'importance de l'éthique sont à l'origine de la réduction et de l'éventuel arrêt complet des tests de toxicité chez les animaux. Les effets constatés, suite à l'administration d'une molécule dans un organisme humain, sont très souvent complexes et variés et il est très difficile de tous les appréhender expérimentalement. D'un point de vue physiologique, anatomique et biochimique, les animaux (et en particulier les mammifères) sont proches des êtres humains. Jusqu'à présent, les expérimentations animales, ayant pour but d'étudier et surtout de prédire (par analogie) les effets d'une molécule sur l'organisme humain, ont probablement été la meilleure option en l'absence de données chez l'homme. Actuellement, deux autres options s'offrent à nous et permettent une utilisation réduite d'animaux pour les expérimentations. La première consiste en l'étude des biomarqueurs qui permettent d'effectuer des observations directement sur l'être humain. La seconde, sur laquelle nous allons nous attarder, consiste en l'utilisation de systèmes expérimentaux simples *in vitro*. Le principal avantage de ces systèmes est qu'ils peuvent être basés sur des cellules humaines. Le principal inconvénient est que cette simplicité ne reflète pas correctement, en l'état, la complexité de l'organisme humain dans sa totalité. Il existe plusieurs solutions qui permettent de pallier cet inconvénient : l'augmentation de la complexité des systèmes *in vitro* pour reproduire la structure des tissus et leur organisation dans le corps humain (« human on chip » par exemple [10]) et l'utilisation de modèles mathématiques qui simulent numériquement le comportement du corps humain, associés à des données *in vitro* pour calibrer les paramètres de ces modèles. Ces solutions sont complémentaires [11].

Pour la modélisation mathématique, deux disciplines vont être principalement utilisées : la pharmacocinétique (PK) et la pharmacodynamie (PD), qu'il est usuel de différencier mais qui sont en réalité très liées. L'influence de la PK sur la PD n'est pas à remettre en cause et est souvent prise en compte lors de la construction de modèles mixtes, dits PK/PD. Dans ce cas, les concentrations (ou quantités) obtenues en sortie du modèle PK sont utilisées comme entrée dans le modèle PD. Cependant il est rare, actuellement, que la situation inverse se présente. En effet, peu de modèles donnent à la PD la possibilité d'agir sur la PK. Pourtant, un nombre très important d'effets modélisés par les modèles de PD ont, d'un point de vue biologique, un impact potentiel et souvent direct sur la

PK. Par exemple, les quantités de cytochromes P450 (CYP), de transporteurs ou bien encore de protéines de liaisons peuvent être des composantes d'un modèle PD. Or, toutes ces molécules peuvent avoir un effet direct sur la PK puisqu'elles conditionnent l'absorption, la distribution ou l'élimination des molécules, et leur quantité est donc un facteur important à prendre en compte. Ainsi, selon les éléments présents et quantitativement suivis dans la partie PD d'un modèle PK/PD, il peut être judicieux d'ajouter des équations permettant de lier la PD à la PK en plus de celles qui permettent de relier la PK à la PD. Au niveau de la modélisation pharmacocinétique, il est important de bien définir un modèle de PK *in vitro* qui permette d'intégrer la distribution de la molécule étudiée au niveau cellulaire et telle qu'elle se manifeste lors des expérimentations. Cette distribution *in vitro* n'est pas exactement la même que celle rencontrée dans l'organisme, mais selon le type cellulaire, elle peut s'en approcher fortement. Ainsi, les phénomènes d'accumulation ou d'efflux cellulaire seront la plupart du temps présents *in vitro*, s'ils le sont *in vivo*, et pourront être pris en compte grâce à ce type de modèle. Concernant ces modèles de PK *in vitro*, il est nécessaire de bien connaître les propriétés physico-chimiques de la molécule étudiée, et principalement ses capacités à créer des interactions avec le matériel et les produits utilisés lors de l'expérimentation. En effet, la dose *in vitro* nominale ne correspond pas systématiquement à la dose d'exposition cellulaire. Selon l'affinité de la molécule pour le support et pour les protéines ou toute autre molécule présente dans le milieu réactionnel, une quantité plus ou moins importante de la molécule étudiée peut se retrouver fixée à ces éléments et se retrouve donc indisponible pour les cellules. Ainsi, il est souvent nécessaire d'incorporer au modèle de PK *in vitro* des équations permettant de prendre en compte toutes ces interactions. L'utilité de créer des modèles de distribution *in vitro* se retrouve aussi dans le fait que les effets observés après administration d'une molécule sont souvent mieux corrélés à la concentration de cette molécule dans la cellule plutôt qu'à l'extérieur. Enfin, pouvoir prédire la concentration intracellulaire pour ensuite l'utiliser dans des couplages avec d'autres modèles (toxicodynamique, pharmacodynamique, etc...) permet de s'affranchir des conditions expérimentales. Dans le cas où le choix se porte sur la concentration extracellulaire, la corrélation entre concentration et effet sera probablement moins bonne. De plus, il faudra aussi se questionner sur la signification de la concentration extracellulaire utilisée et sa correspondance avec l'*in vivo*, car il existe de très fortes différences entre la plupart des matrices retrouvées *in vivo* (plasma, sang) et celles utilisées lors des expérimentations (milieu de culture).

Un autre élément à ne pas négliger lors de l'extrapolation *in vitro-in vivo*, est le fait qu'un organe n'est pas un simple amas de cellules toutes branchées en dérivation. C'est une structure complexe, dans laquelle les cellules sont organisées d'une façon bien précise et c'est cette

architecture qui bien souvent rend la fonction de l'organe possible. Ne pas prendre en compte cette structure, quel que soit l'organe, ne permet pas d'appréhender les subtilités de certaines réactions incluant par exemple les phénomènes de coopération cellulaire, et qui peuvent être parfois la source même de l'effet ou du mécanisme étudié. Enfin, dans le cas d'un modèle de toxicité cellulaire, les phénomènes de réparation sont probablement liés à l'architecture/structure particulière de l'organe [12,13].

L'étape suivante consiste à prédire la réponse pharmacodynamique. Actuellement, l'hypothèse la plus utilisée pour les extrapolations *in vitro* vers *in vivo* consiste à supposer qu'une même concentration intracellulaire conduit aux mêmes effets, à la fois qualitativement et quantitativement, *in vitro* et *in vivo*. Dans ce cas, il suffit de développer un modèle PD mettant en relation la concentration retrouvée dans le milieu extra-cellulaire (ou dans certains cas directement dans la cellule) avec la réponse observée *in vitro*, pour ensuite transposer ce modèle sans modification et utiliser comme entrée les profils de concentration obtenus grâce à un modèle PK (PBPK par exemple) afin de prédire en sortie les effets *in vivo*. Se présente aussi un autre problème lors de l'extrapolation, car en plus de la structure des organes qui est différente d'un simple *pool* de cellules, les individus qui forment une population sont très différents entre eux, que ce soit d'un point de vue physiologique qu'anatomique ou biochimique (enzymes de métabolisme). Il est donc important de prendre aussi en compte cette variabilité.

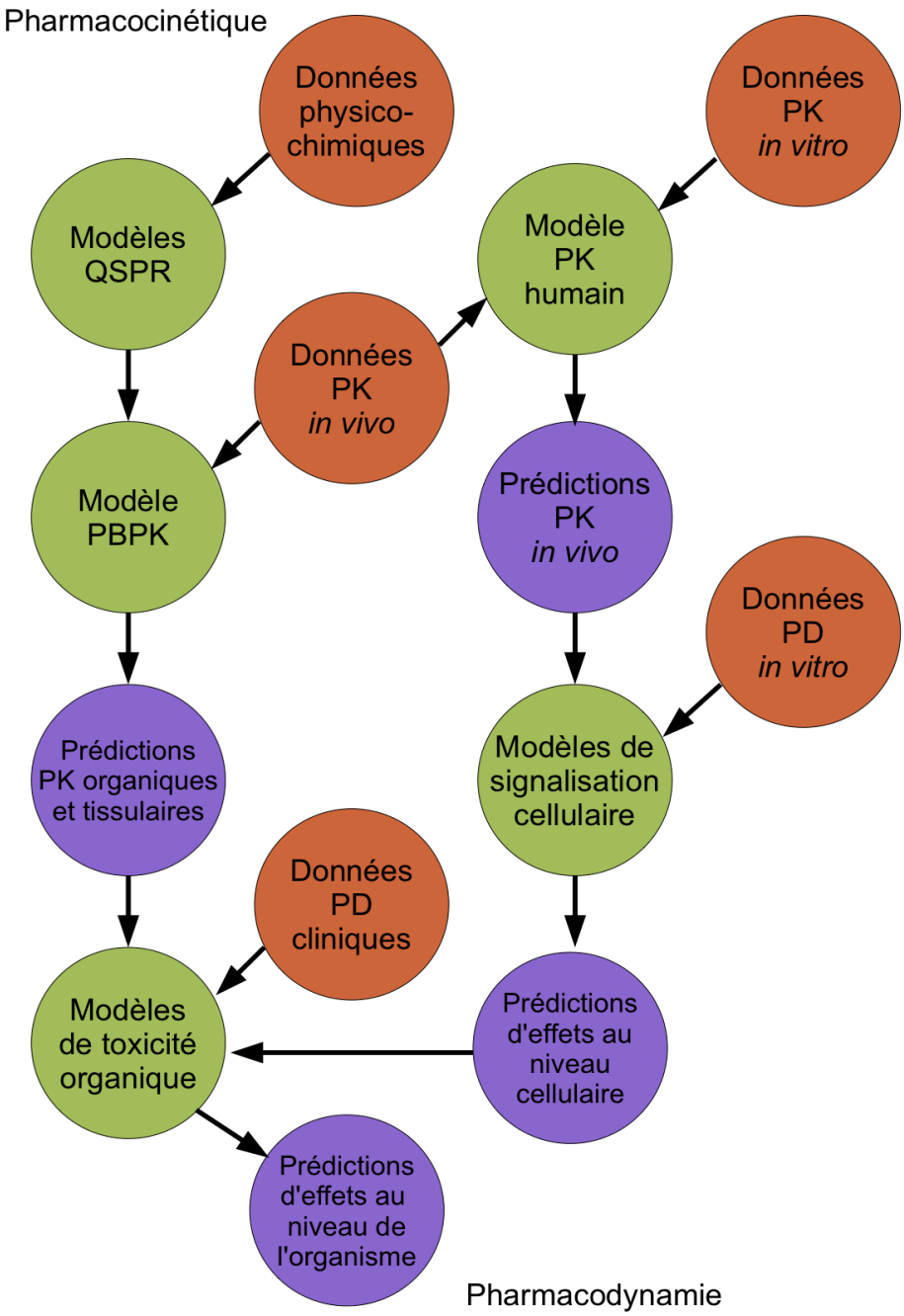


Figure 2 : Les principales composantes et étapes de l'extrapolation quantitative *in vitro-in vivo* et de la prédiction de la toxicité. Les prédictions (en violet) de PK *in vitro*, de PK au niveau de l'organisme, des effets cellulaires et des effets sur l'organisme, sont réalisées à partir de plusieurs types de modèles (en vert). Ces modèles doivent être en mesure d'intégrer des données (en rouge-orangé) provenant de diverses sources.

2.2. Pharmacocinétique

La pharmacocinétique est l'étude, en fonction du temps, du devenir d'une molécule dans un organisme vivant. Les trois phases de la pharmacocinétique sont l'absorption, la distribution et l'élimination aussi écrites sous la forme ADE. Certaines de ces phases peuvent être successives, mais ne sont, qu'à de rares moments, exclusives. De ce fait, elles vont, très souvent, se chevaucher dans le temps. Par exemple, la phase d'absorption est en général suivie de la phase de distribution, cependant cette dernière commence bien avant que la phase d'absorption ne soient terminée. De plus, la phase d'élimination s'étend souvent, en réalité, sur la quasi totalité du processus global.

Toutes les phases de la pharmacocinétique peuvent être décrites et détaillées de manière qualitative et quantitative. Par exemple, pour la phase d'absorption, il est important de localiser précisément le lieu de l'absorption (au niveau de l'estomac, du jéjunum, du duodénum, etc) mais aussi les mécanismes impliqués dans le passage membranaire de la molécule étudiée (passage transcellulaire ou paracellulaire, passage actif ou passif). D'un point de vue quantitatif, il faut être en mesure de définir la vitesse d'absorption et la quantité absorbée qui conditionnent la biodisponibilité. La quantité d'informations à récolter dans une étude de pharmacocinétique est donc très importante, car pour toutes les autres phases de la pharmacocinétique il faut spécifier, déterminer et quantifier autant de propriétés et de paramètres que pour la phase d'absorption.

L'étude des mécanismes impliqués dans l'absorption, la distribution et l'élimination d'une molécule est une composante majeure de l'élaboration d'un modèle pharmacocinétique. En effet, ces mécanismes biologiques conditionnent très fortement la pharmacocinétique même de la molécule étudiée puisqu'ils vont avoir un impact direct sur les paramètres d'absorption, de distribution et d'élimination de cette molécule. Parmi ces mécanismes, nous pouvons citer les transporteurs d'influx ou d'efflux qui vont jouer un rôle dans toutes les phases (absorption, distribution et élimination), mais aussi toutes les enzymes du métabolisme, qu'elles soient de phase I (comme les cytochromes P450) ou de phase II (comme les enzymes de conjugaison), qui peuvent, selon la molécule étudiée, être déterminantes pour la phase d'élimination.

La pharmacocinétique appliquée au développement d'un médicament n'est pas à considérer comme une matière isolée car elle est étroitement liée à d'autres disciplines. Effectivement, la phase d'absorption va être liée au mode d'administration mais surtout à la formulation du médicament, et la phase de distribution va être associée aux effets du médicament sur l'organisme qu'ils soient

bénéfiques (plutôt pharmacologique) ou délétères (toxicologiques). Le lien qui relit l'étape de formulation du médicament à ces effets pharmacologiques et toxicologiques s'appelle la biopharmacie. La modification de la formulation d'un médicament ou de son mode d'administration va avoir d'importantes conséquences sur sa pharmacocinétique. Par exemple, une forme à libération prolongée permet généralement d'augmenter la durée d'exposition en concentration active d'un médicament.

La modélisation du devenir d'une molécule dans l'organisme permet de déterminer des grandeurs caractéristiques de la molécule étudiée, qui permettront, dans le cas d'un usage en clinique ou en toxicologie, d'appréhender plus facilement les avantages et les risques de son utilisation et de la comparer avec d'autres molécules. Chacune des trois phases de la pharmacocinétique est associée à un de ces paramètres primaires : la biodisponibilité pour l'absorption, le volume de distribution pour la distribution et la clairance pour l'élimination. Ces trois paramètres permettent principalement de quantifier les phases auxquelles ils correspondent.

La biodisponibilité d'une molécule correspond à l'étude de la quantité de cette molécule qui atteint la circulation sanguine générale et de la vitesse avec laquelle elle l'atteint, et dépend d'une quantité importante de facteurs. En effet, la plupart des paramètres rencontrés dans la phase d'absorption et une grande partie de ceux rencontrés dans la phase d'élimination vont avoir une influence sur la biodisponibilité d'une molécule. Ainsi, dans le cas d'une administration orale, le coefficient d'absorption intestinal (qui lui-même dépend des propriétés physico-chimiques de la molécule étudiée et des caractéristiques physiologiques des entérocytes), le coefficient d’extraction intestinal, le coefficient d'extraction hépatique et, parfois même, le coefficient d'extraction pulmonaire, vont avoir un impact sur la biodisponibilité de la molécule étudiée. En pharmaceutique, la biodisponibilité est une information capitale car elle détermine la posologie d'un médicament ainsi que sa forme pharmaceutique et sa voie d'administration.

La distribution d'une molécule dans un organisme est dépendante de trois processus : la diffusion, la perméabilité et la liaison aux protéines plasmatiques. Cette distribution est directement liée aux propriétés physico-chimiques de la molécule étudiée, telles que le poids moléculaire ou le degré de ionisation caractérisé par le *pKa*, ainsi qu'aux propriétés physiologiques de l'organisme comme les propriétés intrinsèques des barrières membranaires. Au niveau des espaces physiologiques dans lesquels une molécule peut se distribuer, on retrouve l'espace intra-vasculaire (environ 3 litres pour le plasma et 5 litres pour le sang, pour le corps humain), l'espace extra-

vasculaire (environ 15 litres pour le corps humain) et l'espace intra-cellulaire (environ 25 litres pour le corps humain).

La clairance correspond à la capacité d'un organe ou d'un organisme à épurer un volume de fluide par unité de temps et implique plusieurs types de mécanismes, directs ou indirects. Ainsi, la clairance est associée à la phase d'élimination et il est possible de différencier les mécanismes associés à la phase d'excrétion (mécanismes directs) de ceux associés à la phase du métabolisme (mécanismes indirects). Dans les mécanismes directs, on trouve notamment l'excrétion biliaire, rénale, pulmonaire ou encore salivaire, et dans les mécanismes indirects, on trouve toutes les enzymes impliquées dans le métabolisme (quelle que soit leur localisation). L'étude de la clairance est très importante et savoir déterminer quelle clairance (hépatique, rénale, etc...) est majoritaire l'est tout autant, car selon l'organe ou les organes à l'origine de l'élimination d'une molécule, une insuffisance rénale ou hépatique pourra avoir un impact sur la clairance d'une molécule et sera donc à prendre en compte dans l'étude pharmacocinétique de cette molécule.

2.2.1. Exemple de modèle pharmacocinétique simple : modèle monocompartimental d'un bolus intraveineux

Le modèle monocompartimental d'un bolus intraveineux est le plus simple. Il est composé d'un seul compartiment et d'une seule fonction de sortie. Cette fonction de sortie est très souvent fixe (non mixte) et elle est donc, soit d'ordre zéro (vitesse constante), soit d'ordre un (vitesse proportionnelle à la quantité/concentration). Ce modèle ne comporte pas de fonction d'entrée car lors d'une administration par bolus intraveineux, toute la quantité de molécule administrée se retrouve instantanément dans le système sanguin. Dans ce type de modèle, il est supposé que la distribution de la molécule étudiée est homogène dans l'organisme. Cette hypothèse est rarement vérifiée dans le cas où la molécule étudiée se distribue réellement dans tout l'organisme. Cependant, cette hypothèse permet de faciliter une première approche et surtout, elle peut se révéler proche de la réalité dans le cas où la distribution de la molécule étudiée se restreint à l'eau du corps (par exemple la caféine [14]), au compartiment sanguin ou à un même groupe de tissus.

Dans le cas d'une fonction de sortie d'ordre un où les mécanismes impliqués dans l'élimination de la molécule étudiée sont supposés non saturables, l'équation différentielle permettant de modéliser la situation est la suivante :

$$\frac{\partial X}{\partial t} = -k_e . X \quad (1)$$

La résolution de cette équation permet d'obtenir une forme explicite :

$$X(t) = X(0) . e^{-k_e . t} \quad (2)$$

Cette équation étant de type exponentiel, elle devient affine en utilisant une échelle semi-logarithmique. Sur une représentation affine il est possible de retrouver facilement certains paramètres tels que la constante d'élimination (k_e) qui correspond à la pente de la droite, et la concentration au temps zéro (C_0) qui correspond à l'ordonnée à l'origine.

Dans le cas d'une fonction de sortie d'ordre zéro où les mécanismes impliqués dans l'élimination de la molécule étudiée sont supposés saturés, l'équation caractéristique du modèle est la suivante :

$$\begin{cases} \frac{\partial X}{\partial t} = -k_0 \\ X(t) > 0 \end{cases} \quad (3)$$

La résolution de cette équation permet d'obtenir une forme explicite :

$$\begin{cases} X(t) = X(0) - k_0 . t \\ X(t) > 0 \end{cases} \quad (4)$$

Le paramètre de pente k_0 se calcule en déterminant le coefficient directeur de la droite qui est directement visible au niveau de la représentation graphique de la concentration de la molécule étudiée en fonction du temps. Le paramètre de hauteur, qui correspond à la concentration au temps zéro (C_0), est égal à l'ordonnée à l'origine de cette même droite.

Dans le cas où un modèle monocompartimental ne permet pas de représenter correctement les données observées, il est possible d'ajouter d'autres compartiments afin d'améliorer les prédictions.

Par exemple, si une molécule ne se distribue que dans le compartiment sanguin, n'est pas métabolisée et est éliminée très majoritairement par le rein, une approche consistant à utiliser un modèle monocompartimental peut être suffisante. Alors qu'à l'inverse, si une molécule se distribue dans tout l'organisme de manière très hétérogène et est éliminée par plusieurs mécanismes différents, il sera probablement nécessaire d'utiliser un modèle multicompartimental ou un modèle physiologique.

2.2.2. Modèles physiologiques (PBPK)

Les premiers travaux de modélisation en pharmacocinétique [15 ,16] sont en réalité basés sur des descriptions physiologiques de l'organisme. Cependant, à cette époque, les modèles mathématiques correspondants étaient trop complexes pour être résolus. Par la suite et comme vu précédemment, des modèles plus simples ne comportant qu'un, deux, voire trois compartiments ont été proposés [17]. Ces modèles se sont avérés suffisants pour décrire et interpoler les profils de concentration en fonction du temps de nombreux médicaments dans le sang ou dans d'autres matrices biologiques. Toutefois, pour les substances avec des cinétiques complexes, ou pour la nécessité d'extrapolations inter-espèces, ces modèles se sont révélés insuffisants et la recherche s'est tournée de nouveau vers les modèles physiologiques [18 ,19 ,20 ,21].

Au fil des années, les capacités de calcul sans cesse croissantes et l'avènement de méthodes statistiques applicables à l'incertitude et à la modélisation de la variabilité des populations, ont permis de développer efficacement les modèles PBPK. Un progrès important a été le développement de modèles quantitatifs structures-propriétés permettant de calculer les paramètres présents dans les modèles PBPK (comme les coefficients de partage dans les tissus). Ces développements sont toujours en cours et ont conduit à la conception de modèles génériques et détaillés qui peuvent fournir rapidement des réponses, au moins approximatives, aux questions pharmacocinétiques, uniquement sur la base de la formule chimique d'une molécule et de quelques données *in vitro* concernant cette molécule (sur le métabolisme, en particulier) [22].

Les différentes étapes de construction d'un modèle PBPK seront présentées. Puis, la détermination des valeurs des paramètres et les problèmes de variabilité connexe seront traités et enfin, les applications génériques des modèles PBPK ainsi que les perspectives de leur développement seront décrites et discutées.

2.2.2.1. Construction d'un modèle PBPK

Principes de bases et équations

Un modèle PBPK représente l'organisme d'intérêt - humain, rat, souris, etc - comme un ensemble de compartiments, correspondant chacun à un tissu, à un organe, ou à un groupe d'organes ayant un taux similaire de perfusion sanguine (ou perméabilité) et la même affinité pour la molécule d'intérêt. Les transports entre ces compartiments, via le sang ou la lymphe, sont décrits par des équations mathématiques dont la structure est régie par la physiologie (par exemple, le débit sanguin de sortie d'un tronçon de l'intestin vers le foie, etc) [23]. En tant que tels, les modèles PBPK offrent une approche intégrée pour comprendre et prédire le comportement pharmacocinétique des substances chimiques dans la totalité de l'organisme.

La vitesse de distribution des molécules dans un tissu peut être limitée à cause de la perfusion ou de la perméabilité. Une cinétique perfusion-limitante se retrouve dans le cas où les membranes de tissus ne présentent pas de barrière à la diffusion. Dans le cas de molécules transportées principalement par le sang, comme souvent observé, le débit sanguin devient donc le facteur limitant pour la distribution dans les différentes cellules de l'organisme. Cette hypothèse est généralement vérifiée pour les petites molécules lipophiles. Un modèle PBPK perfusion-limitante est visible sur la Figure 3.

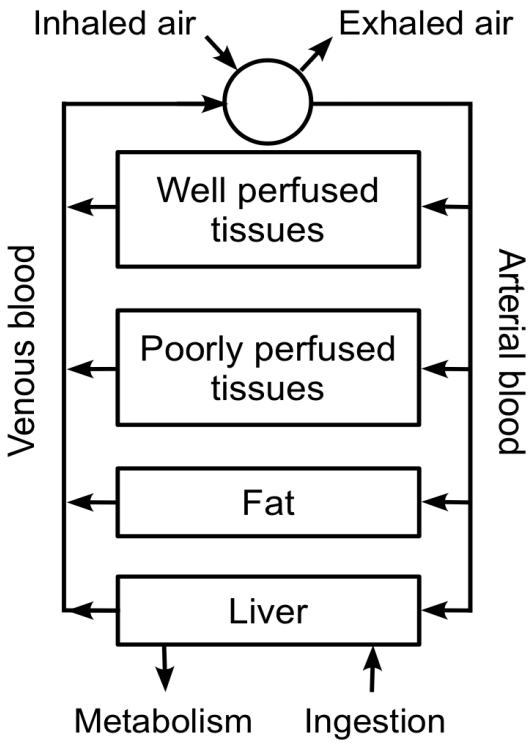


Figure 3 : Représentation schématique d'un modèle PBPK simple.

Ce modèle inclut le foie, les tissus bien perfusés (SNC, les reins et les autres viscères), les tissus mal perfusés (muscles et de la peau) et le tissu adipeux. Les organes ont été regroupés dans ces compartiments selon leur taux de perfusion sanguine et leur teneur en lipides. En vertu de ces critères, le foie pourrait être ajouté au compartiment regroupant les tissus bien perfusés, cependant il a été laissé seul ici car c'est le principal site du métabolisme. C'est aussi un site d'action important et il peut être assimilé à une porte d'entrée si l'administration est orale (*via* l'intestin puis la veine porte). Les os ou tout autre organe peuvent être exclus du modèle à condition d'être sûr que la substance d'intérêt ne se distribue pas dans ces derniers. Chacun de ces compartiments est approvisionné en molécule d'intérêt par l'intermédiaire de sang artériel. Toujours dans le cas d'une cinétique perfusion-limitée, la vitesse instantanée d'entrée dans un compartiment est tout simplement égale à la vitesse d'écoulement volumétrique (du sang) multipliée par la concentration en molécule d'intérêt dans le sang entrant (artériel la plupart du temps). À la sortie de l'organe, la concentration en molécule d'intérêt dans le sang veineux est supposée être en équilibre avec la concentration du compartiment, avec un rapport d'équilibre appelé "coefficient de partage" ou "constante d'affinité" [24]. Par exemple, la cinétique du composé dans le compartiment regroupant les organes mal perfusés peut être décrite par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{\partial Q_{pp}}{\partial t} = F_{pp}\left(C_{art} - \frac{Q_{pp}}{P_{pp} V_{pp}}\right) \tag{5}$$

où Q_{pp} est la quantité de molécule d'intérêt à un temps donné dans le compartiment regroupant les organes mal perfusés, F_{pp} le débit volumétrique du sang irriguant ce compartiment, C_{art} la concentration sanguine artérielle en molécule d'intérêt, P_{pp} le coefficient de partage sang-tissu du compartiment étudié et V_{pp} le volume du compartiment étudié. Le coefficient de partage sang-tissu P_{pp} mesure l'affinité relative de la substance pour le tissu par rapport au sang. Il est facile de vérifier qu'à l'équilibre :

$$\frac{\partial Q_{pp}}{\partial t} = 0 \;\Rightarrow\; C_{art} - \frac{Q_{pp}}{P_{pp} V_{pp}} = 0 \;\Rightarrow\; P_{pp} = \frac{C_{pp}}{C_{art}} \tag{6}$$

où C_{pp} correspond à la concentration en molécule d'intérêt dans le compartiment regroupant les organes mal perfusés.

De même, la cinétique de la molécule d'intérêt dans le compartiment regroupant les organes bien perfusés et dans celui représentant le tissu adipeux, peut être décrite par les équations différentielles suivantes :

$$\frac{\partial Q_{wp}}{\partial t} = F_{wp}\left(C_{art} - \frac{Q_{wp}}{P_{wp} V_{wp}}\right) \tag{7}$$

$$\frac{\partial Q_{fat}}{\partial t} = F_{fat}\left(C_{art} - \frac{Q_{fat}}{P_{fat} V_{fat}}\right) \tag{8}$$

L'équation pour le foie est plus complexe car elle intègre un terme pour la clairance métabolique composée d'une équation d'ordre un avec une constante de vitesse k_{met}, et d'un terme correspondant au taux d'ingestion orale de la molécule administrée, R_{ing} (qui correspond au taux d'administration si l'absorption de l'intestin est terminée, ou à une fraction de celui-ci dans le cas contraire) :

$$\frac{\partial Q_{liv}}{\partial t} = F_{liv}\left(C_{art} - \frac{Q_{liv}}{P_{liv} V_{liv}}\right) - k_{met} Q_{liv} + R_{ing} \tag{9}$$

De toute évidence il s'agit d'un modèle de métabolisme minimaliste, et des termes beaucoup plus complexes peuvent être utilisés, comme par exemple, pour décrire un métabolisme saturable ou impliquant plusieurs enzymes, ou pour prendre en compte de potentielles interactions métaboliques, ou un métabolisme extra-hépatique. De plus, si la substance est volatile et si l'accumulation dans le tissu pulmonaire lui-même est négligée, la concentration dans le sang artériel (C_{art}) peut être calculée comme suit, en supposant que l'équilibre est instantané entre le sang et l'air dans les poumons :

$$C_{art} = \frac{F_{pul}\left(1 - r_{ds}\right) C_{inh} + F_{tot} C_{ven}}{F_{pul}\left(1 - r_{ds}\right) / P_a + F_{tot}} \tag{10}$$

où F_{tot} est le débit sanguin arrivant dans le poumon, F_{pul} le taux de ventilation pulmonaire, r_{ds} la fraction de l'espace mort (volume des voies respiratoires supérieures indisponible pour les échanges sang-air), et P_a le coefficient de partage air-sang. C_{ven} est la concentration de la molécule d'intérêt dans le sang veineux et peut être obtenue en calculant la somme des différentes concentrations retrouvées dans le sang veineux à la sortie de chaque organe pondéré par les flux sanguins correspondants :

$$C_{ven} = \frac{\sum_{x \in \{pp,wp,fat,liv\}} \left(\frac{F_x Q_x}{P_x V_x} \right)}{F_{pp} + F_{wp} + F_{fat} + F_{liv}} \tag{11}$$

Enfin, la concentration de la molécule étudiée dans l'air expiré C_{exh}, peut être calculée en utilisant l'équation 6 :

$$C_{exh} = \left(1 - r_{ds}\right) \frac{C_{art}}{P_a} + r_{ds} C_{inh} \tag{12}$$

Les équations présentées précédemment supposent que l'ensemble de la molécule étudiée présente dans le sang est disponible pour les échanges avec les tissus. Cela peut ne pas être vrai, si par exemple, une fraction de la substance est liée à des protéines ou est internalisée dans les cellules circulant dans le sang. Dans ce cas, il est souvent admis que ces phénomènes de liaison sont plus rapides que les phénomènes de distribution et les échanges décrits ne dépendent que de la fraction libre.

Pour certaines molécules, la diffusion à travers les barrières vasculaires ou les membranes cellulaires peut être plus lente que la perfusion. C'est souvent le cas pour les grosses molécules ou les molécules polaires. Dans ce cas, pour tenir compte de la limitation de la diffusion, un sous-compartiment vasculaire est généralement ajouté à chaque organe ou tissu d'intérêt [24]. La diffusion entre ce sous-compartiment vasculaire et le reste du tissu est modélisée en utilisant la loi de Fick. Une barrière de diffusion peut également exister entre les milieux extra-cellulaire et intra-cellulaire. Par conséquent, en fonction du nombre de compartiments utilisés, de leurs subdivisions éventuelles et du type d'équation utilisé, les modèles PBPK présentent des degrés de complexité très différents.

Paramètres et variabilité

Après l'écriture des équations du modèle, l'étape suivante consiste à attribuer des valeurs aux paramètres introduits dans ce modèle. Un modèle PBPK a besoin d'une quantité considérable d'informations. Au niveau du système, il y a plusieurs types de paramètres qui sont spécifiques de l'organisme étudié. Ces paramètres peuvent être anatomiques (comme le volume de l'organe), physiologiques (comme le débit cardiaque) voire biochimiques (comme les concentrations d'enzymes). Tous ces paramètres ne dépendent pas de la ou des molécule(s) d'intérêt, et sont relativement bien documentés chez les humains et les espèces animales [23,25 ,26 ,27]. De ces paramètres propres à l'organisme étudié, il est important de différencier les paramètres spécifiques de la molécule d'intérêt. Ces paramètres dépendent directement des caractéristiques physico-chimiques de la molécule d'intérêt et vont avoir une influence sur ses propriétés pharmacocinétiques (par exemple, le *pKa* aura un impact sur l'absorption, la lipophilie sur la distribution, et le poids moléculaire sur le taux de filtration glomérulaire). Toutefois, quand le lien entre les propriétés physico-chimiques de la molécule d'intérêt et les paramètres spécifiques de cette molécule n'est pas toujours clair et défini (comme c'est souvent le cas avec le métabolisme, par exemple), ces paramètres doivent être mesurés *in vitro* [28] ou estimés à partir d'expériences *in vivo* et donc plus difficiles à obtenir.

Pour beaucoup de ces paramètres, le fait d'utiliser une même valeur pour tous les individus ne permet pas de retrouver la diversité des réponses obtenues dans une population réelle. En pharmacocinétique, la variabilité inter-individuelle peut avoir des conséquences directes et importantes sur l'efficacité et la toxicité, en particulier pour les molécules actives ayant une fenêtre thérapeutique étroite. Par conséquent, la simulation de la variabilité inter-individuelle doit faire partie intégrante de la prédiction chez les humains. La composante mécaniste des modèles PBPK

fournit la capacité de prédire la variabilité inter-individuelle en pharmacocinétique à condition que l'information requise soit correctement et suffisamment prise en compte. À cet effet, deux stratégies de modélisation ont été développées en parallèle : la première approche a été principalement utilisée pour les molécules pour lesquelles nous possédons beaucoup de données cliniques. Elle allie un modèle pharmacocinétique pour décrire les profils de concentration en fonction du temps au niveau individuel et un modèle statistique aléatoire pour extraire des estimations *a posteriori* de la variabilité d'un groupe de sujets [29]. Dans un contexte bayésien, un modèle PBPK peut être utilisé au niveau individuel, ce qui permet l'intégration de nombreuses covariables sujets spécifiques [30]. La seconde approche tire également parti de la capacité prédictive des modèles PBPK mais attribue seulement une distribution *a priori* pour les paramètres du modèle (par exemple, les paramètres du métabolisme, les flux sanguins, les volumes des organes) et forme des distributions de prédictions par l'utilisation de simulations Monte Carlo [5].

Résolution des équations

Compte-tenu de la complexité relative des équations, il est essentiel d'être capable de les résoudre numériquement. Une liste non exhaustive de logiciels permettant d'utiliser, voire créer des modèles PBPK, est donnée dans le Tableau 1. Certains logiciels sont dédiés à la modélisation PBPK et proposent des valeurs ou des distributions prédéfinies pour les paramètres. D'autres logiciels plus généraux permettent de définir des systèmes d'équations différentielles, mais l'utilisateur doit fournir lui-même les valeurs des paramètres. Aucun de ces logiciels n'est actuellement parfait et chacun possède ses inconvénients dont la plupart se retrouvent dans l'utilisation complexe de l'interface, la vitesse de calcul ou la flexibilité du langage de modélisation.

Tableau 1 : Principaux logiciels utilisés en PBPK.

Nom du logiciel	Fournisseur	Site internet
Logiciel dédié à la modélisation PBPK		
Cloe Predict	Cyprotex Ltd.	www.cyprotex.com/cloepredict/
GastroPlus	Simulations Plus Inc.	www.simulations-plus.com
PK-Sim	Bayer Technology Services	www.systems-biology.com
Simcyp Simulator	Simcyp Ltd/Certara.	www.simcyp.com
Logiciel non dédié à la modélisation PBPK		
ADAPT 5	Biomedical Simulations Resource, USC	bmsr.usc.edu/
acslX	The AEgis Technologies Group Inc.	www.acslx.com/
Berkeley Madonna	University of California at Berkeley	www.berkeleymadonna.com/
GNU MCSim	Free Software Foundation	www.gnu.org/software/mcsim/
GNU Octave	University of Wisconsin	www.octave.org/
MATLAB	The MathWorks Inc.	www.mathworks.com/
MLAB	Civilized Software Inc.	www.civilized.com/
ModelMaker	ModelKinetix	www.modelkinetix.com/
NONMEM	ICON	www.icondevsolutions.com/
PhysioLab	Entelos Inc.	www.entelos.com/
SAAM II	University of Washington	depts.washington.edu/saam2/
Phoenix WinNonlin	Pharsight	www.pharsight.com

2.2.2.2. Utilisation des modèles PBPK

Les modèles PBPK permettent de réaliser différents types d'extrapolations selon l'objectif souhaité : comparaison de doses, de voies d'administration ou de rythme d'administration par exemple (doses répétées). Ils peuvent aussi être utilisés pour extrapoler entre différentes espèces animales, ce qui est une de leurs applications originales. Actuellement, leur utilisation majeure se retrouve dans la prédiction de la variabilité inter-individuelle et intra-individuelle de la pharmacocinétique des médicaments.

Le principe général de l'extrapolation de dose est de permettre, à partir d'un modèle mathématique, d'estimer la valeur d'une dose conduisant aux résultats désirés. Ces derniers peuvent être, par exemple, une concentration dans un organe en particulier, ou un effet observé spécifique. L'extrapolation de dose est indispensable dans les situations suivantes : le calcul de la première dose

administrable chez l'homme pour les essais cliniques, l'extrapolation de la dose dans la pratique vétérinaire et l'extrapolation de la dose à des fins expérimentales. Du fait qu'ils sont plus complets, l'utilisation de modèles PBPK peut permettre d'améliorer cette extrapolation et ainsi diminuer le risque d'accident médicamenteux par surdosage, par exemple.

2.2.2.3. Perspectives concernant les modèles PBPK

De nos jours, les modèles PBPK développés sont perfectibles sur de nombreux points. La tendance actuelle est d'ajouter de plus en plus de sous-compartiments afin d'apporter plus de détails aux différents organes inclus dans le modèle pour se rapprocher le plus possible de la réalité physiologique. Deux points concernant l'amélioration des modèles PBPK et ayant un rapport direct avec le sujet développé dans ce manuscrit vont être développés.

Le premier qu'il est intéressant de développer dans les modèles PBPK, et sur lesquels les pharmacocinéticiens travaillent le plus, est le niveau de détail des modèles au niveau organique.

Par exemple, plusieurs modèles d'absorption orale physiologiques ont été développés pour simuler une absorption plus mécaniste (ACAT, ADAM, ...). Ces modèles sont constitués de plusieurs sous-compartiments correspondant chacun à un segment différent du tube digestif (premier segment du duodénum par exemple, etc...). Une série d'équations différentielles est utilisée pour décrire chaque étape que va subir la molécule administrée : la libération (dans le cas d'un médicament principalement), la dissolution, la dégradation, le métabolisme, l'absorption et le transfert entre chaque segment. Chaque organe est une structure complexe, dans lequel les cellules sont organisées d'une manière bien particulière et c'est souvent cette architecture très spécifique qui rend la fonction de l'organe possible. D'un point de vue pharmacocinétique, considérer cette structure et ce, quel que soit l'organe, permettrait de prendre en compte toutes les subtilités que présentent les principaux mécanismes biologiques qui jouent un rôle dans les étapes d'absorption, de distribution et d'élimination d'une molécule.

Le second point qu'il est intéressant et utile de développer dans les modèles PBPK est l'inclusion de voies de signalisation. C'est-à-dire l'ensemble des réactions qui vont de la liaison du ligand aux récepteurs jusqu'à la phase de transduction du signal qui en découle, et l'implication de tous les seconds messagers. En effet, les différents messagers impliqués dans la phase de transduction sont considérablement importants pour la compréhension d'un mécanisme biologique. Leur prise en compte dans la conception d'un modèle peut donc améliorer de façon notoire les

prédictions. Dans toutes les phases de la PK, absorption, distribution, et élimination, de nombreuses enzymes et autres protéines peuvent être impliquées. Or, toutes ces protéines peuvent potentiellement être induites ou réprimées, car pour la plupart elles sont synthétisées par l'organisme lui-même. Ainsi l'induction ou la répression de ces protéines va avoir un impact direct sur la PK même de la molécule étudiée. Par exemple, pour modéliser correctement et avec précision le métabolisme d'une molécule, il est important, dans un premier temps, de connaître les enzymes impliquées dans le métabolisme de celle-ci. Cependant, à elle seule, la prise en compte de ces enzymes, de la relation ligand-récepteur et des potentielles interactions avec d'autres molécules, n'est parfois pas suffisante pour appréhender correctement toutes les variations intra- et interindividuelles qui peuvent exister dans le métabolisme d'une molécule. Les phénomènes d'induction ou de répression d'une enzyme ne sont pas toujours faciles à expliquer. Ces phénomènes sont souvent causés par la présence de multiples messagers secondaires dans la voie de signalisation. De plus, ces messagers sont parfois activés ou inhibés par l'enzyme elle-même, par une autre molécule, par un autre messager secondaire ou même par les trois. Ainsi en l'utilisant dans des modèles de biologie systémique, la connaissance des voies de signalisation et des messagers impliqués dans celles-ci devient un avantage non négligeable dans l'affinement des modèles PBPK.

2.3. Biologie systémique

D'après la définition adoptée par l'initiative ERASysBio, un consortium d'agences de financement de 13 pays européens et associés, « la biologie systémique a pour but de comprendre les interactions dynamiques entre composants d'un système vivant, et entre systèmes vivants en interaction avec l'environnement. La biologie systémique est une approche par laquelle des questions biologiques sont abordées en intégrant les expérimentations avec la modélisation, la simulation et la théorie dans des cycles itératifs. La modélisation n'est pas le but final, mais un outil pour faire avancer la compréhension du système, développer des expérimentations plus ciblées et finalement aboutir à des prédictions. La biologie systémique est par nature intrinsèquement interdisciplinaire et a pour but commun avec les autres disciplines d'aboutir à une compréhension quantitative des processus biologiques dynamiques en se fondant sur des analyses mathématiques et statistiques pour intégrer les données biologiques et développer des modèles prédictifs du comportement biologique » (www.biosyl.org). Plus simplement, il est possible de définir la biologie systémique comme étant l'étude des interactions entre les composants d'un système biologique.

Contrairement à l'idée d'étudier et de caractériser séparément tous les composants individuels d'une cellule (que ce soient les gènes, les protéines, les ARN, etc...), la biologie systémique consiste à prendre en compte tous ces composants en même temps et à étudier les interactions qui peuvent en résulter. En biologie systémique, le système étudié ne se limite pas à la cellule. Selon les besoins, les données et le niveau de connaissance dans le domaine, le système peut être élargi à un organisme complet voire même à une population. Il n'existe pas, en réalité, de caractéristiques précises ou de limite à la taille du système étudié, même si en pratique on se limite en général au niveau cellulaire. La seule composante qui persiste en biologie systémique est la volonté de comprendre et d'étudier toutes les relations et interactions qui vont co-exister dans le système choisi. La biologie systémique permet l'intégration de la biologie, de la médecine et des sciences de l'environnement par des interactions transdisciplinaires avec les sciences mathématiques, informatiques, chimiques et physiques [31].

Le fait que chaque laboratoire ou unité de recherche se focalise sur un thème, un type cellulaire ou une espèce donnée, a conduit la recherche en biologie à se fragmenter. La découverte et l'utilisation de la biologie moléculaire fut très certainement une avancée majeure pour la recherche en biologie. De plus, en suivant des millions de molécules, en comparant les espèces et en

analysant le vivant dans une grande diversité de conditions environnementales, la biologie moléculaire a pu progresser et être appliquée à grande échelle. Cependant ces progrès n'ont pas été suffisants pour réunifier la recherche en biologie.

Un élément qui pourrait expliquer cette fragmentation est l'incapacité des approches biologiques classiques actuelles à considérer les systèmes biologiques dans leur globalité et donc à appréhender leur complexité. Cette complexité découle de l'extrême hétérogénéité des composants impliqués dans le système, de la nature intrinsèquement dynamique de celui-ci, et du caractère non linéaire de son comportement. Mettre bout à bout les différents composants d'un système n'est donc pas suffisant pour le rendre fonctionnel, il faut prendre en compte les relations et les interactions liant les différents composants et y associer des équations les plus adaptées et flexibles possibles.

Actuellement, le problème n'est plus lié principalement aux limites de calcul du matériel informatique utilisé, ni au fait d'obtenir des données, et ce quelle que soit leur origine : génomique, transcriptomique (TCX), protéomique (PTX) ou métabolomique (MTX). En effet, divers techniques et protocoles permettent déjà de séquencer une grande quantité de génomes, ainsi que de différencier et mesurer rapidement des molécules spécifiques. La limitation provient du traitement de toutes ces données, et c'est là que la biologie systémique intervient (avec la bioinformatique), car prises indépendamment ces données ne révèlent que peu d'informations. C'est en les prenant toutes ensembles (ou en partie pour commencer) qu'il va être possible d'en tirer le plus d'avantages. Il est important de préciser que pour optimiser les modèles de biologie systémique, il faut, en réalité, faire l'acquisition de données spécifiques supplémentaires, car celles-ci ne correspondent pas, généralement, au type de données habituellement collectées par les biologistes. Il est notamment indispensable d'obtenir des données concernant la cinétique des molécules étudiées, et ce sont ces dernières qui font souvent défaut.

La compréhension des phénomènes biologiques est le but primaire de la biologie systémique, et elle passe par l'étude des mécanismes biologiques impliqués et des interactions reliant tous les composant d'un système. Afin de comprendre et d'appréhender au mieux un phénomène biologique, il est souvent nécessaire de faire appel à d'autres disciplines, comme la chimie ou la physique, ce qui a pour conséquence de rendre plus intéressante l'étude du phénomène concerné mais aussi beaucoup plus complexe [31].

Avec les progrès de la bioinformatique, il est désormais possible d'établir des modèles prédictifs basés sur des données génomiques, protéomiques et métabolomiques. Cependant, certains

verrous scientifiques et techniques importants demeurent dans l'intégration des données et dans l'analyse des systèmes biologiques complexes. Le but du profilage génomique et protéomique est multiple. Il permet d'une part d'améliorer l'utilisation des biomarqueurs *via* la découverte de nouveaux plus spécifiques et plus simples à manipuler. D'autre part, ce profilage présente un intérêt pour la modélisation en biologie systémique, car il apporte une quantité considérable de données. L'utilisation de données métabolomiques s'avère être un outil puissant pour obtenir un aperçu des mécanismes de toxicité induits par les xénobiotiques. La plupart des travaux sur les métabolomiques (MTX) ont porté sur la néphro- et l'hépatotoxicité, reliant le dérèglement métabolique avec des critères de toxicité [32 ,33 ,34]. Grâce à l'utilisation de données métabolomiques, Clayton *et al.* [35 ,36], ont démontré l'existence d'un lien entre la créatine et l'hépatotoxicité via des effets sur la synthèse de la cystéine. D'autres approches se basant sur les données MTX ont été menées avec succès pour étudier les mécanismes de la toxicité de l'acétaminophène [37], et du cadmium [38].

Grâce à sa nature particulière qui consiste à mesurer les produits secondaires de multiples gènes et protéines, l'étude des données métabolomiques reflète probablement le mieux l'état métabolique d'une cellule et a donc un grand potentiel pour générer des données précieuses pour une approche orientée biologie systémique. Dans les études de toxicologie et du métabolisme des xénobiotiques, l'approche intégrée visant à utiliser toutes les données omiques (transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques) permettra d'avoir une idée rapide de la toxicité d'un xénobiotique. Dans le cas du développement d'un nouveau médicament, il sera possible d'écarter très tôt toute molécule candidate présentant des risques toxiques importants. En attendant, afin de comprendre les mécanismes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et les événements liés à leur toxicité, la collecte bien contrôlée d'échantillons, l'acquisition de données à haute résolution, le traitement robuste et l'analyse rigoureuse de ces données sont d'une importance capitale et doivent encore être davantage améliorés. Il est clair que l'utilisation des données omiques continuera de jouer un rôle croissant dans les domaines du métabolisme des xénobiotiques et dans l'évaluation de leur innocuité.

2.4. La voie de signalisation Nrf2

Les cellules de l'organisme peuvent être exposées à des oxydants générés par le métabolisme des xénobiotiques, par le métabolisme de composés endogènes ou même parfois produits localement par les cellules intervenant dans la réponse inflammatoire. Ces oxydants sont potentiellement délétères pour l'organisme au travers de mécanismes impliqués et activés par le stress oxydant. Celui-ci survient lors d'un état de déséquilibre entre production de radicaux libres et dégradation de ces radicaux via les systèmes de défense antioxydants, conduisant à une accumulation incontrôlée d'espèces de radicaux libres [39,40]. Les conséquences du stress oxydant sont des modifications chimiques au niveau de certaines molécules, entraînant des modifications structurelles et/ou fonctionnelles. Lorsque les ROS sont produites en excès, elles peuvent réagir avec des molécules diverses telles que des lipides, des glucides, des protéines et de l'ADN. Plusieurs types de mécanismes vont être mis en jeu pour faire face à ces agressions oxydantes : non enzymatiques, comme le glutathion sous sa forme réduite (GSH) ou les vitamines A, E et C ; et enzymatiques, comme la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase, la catalase, ou les enzymes de conjugaison de phase II (sulfotransferases, glutathione S-transferases (GST), *etc*). La régulation des gènes codant pour ces enzymes et molécules anti-oxydantes est notamment contrôlée par l'intermédiaire d'une séquence régulatrice appelée élément de réponse antioxydant (ARE pour antioxidant responsive element). L'activation des ARE nécessite la translocation nucléaire et la liaison d'un facteur de transcription. Il existe différents types de facteurs de transcription qui peuvent conduire à l'activation des ARE : nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), activator protein-1 (AP-1) ou nuclear factor B (NF-κB). Bien que délétères à fortes concentrations, à concentration physiologique les ROS participent à l'homéostasie cellulaire, et sont impliquées dans divers mécanismes biologiques tels que les voies de signalisation intracellulaires et la réponse mitogène. Ainsi elles sont indispensables au bon fonctionnement des cellules et se retrouvent en quantité plus ou moins importante (selon l'état de stress) dans la plupart des cellules d'un organisme.

La réponse au stress oxydant utilisant la voie de signalisation Nrf2 est impliquée dans la protection contre le vieillissement, la neurodégénérescence, la carcinogenèse, l'hépatotoxicité, les maladies cardio-vasculaires et les maladies respiratoires comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et l'emphysème, l'asthme, la fibrose et les agressions pulmonaires aiguës [41].

Le rôle toxico-pathologique du système de défense contrôlé par Nrf2 dans le rein pour les patients atteints de maladies chroniques rénales est une question à aborder. Une récente étude de Kim et Vaziri [1], dans laquelle du tissu rénal provenant de rats atteints de maladie rénale chronique a été utilisé, a montré une insuffisance dans l'activation de Nrf2, conduisant ainsi à un dérèglement conséquent de la synthèse des enzymes antioxydantes. Ils ont conclu que malgré la présence d'un stress oxydant sévère et l'inflammation qui auraient dû induire les gènes impliqués dans la voie Nrf2, une « réduction paradoxale » de l'activation de la voie Nrf2 a été observée dans le tissu rénal prélevé. Par conséquent, il est possible que l'altération de l'activation du système Nrf2 aggrave la génération du stress oxydant dans les maladies rénales chroniques, conduisant à la progression de la maladie. Ainsi, des traitements thérapeutiques visant à augmenter l'activation de la voie Nrf2 pourraient être une stratégie intéressante pour atténuer les effets du stress oxydant et de l'inflammation dans la progression des maladies chroniques rénales.

L'augmentation des taux circulants de marqueurs oxydatifs a été documentée chez des patients ayant des maladies chroniques rénales [42 ,43 ,44]. Dès les premiers stades de l'insuffisance rénale, le stress oxydant se retrouve être impliqué et les traitements par dialyse semblent être inefficaces pour lutter contre cette augmentation du stress oxydant. Cependant, la prévalence du stress oxydant dans les maladies rénales chroniques reste à confirmer, car pour le moment, aucune étude clinique de population n'a été réalisée. Actuellement, l'implication des enzymes et molécules anti-oxydantes et leur voie de régulation via Nrf2 dans le cas d'un stress oxydant est peu connue [45]. Leur compréhension passant, entre autres, par la modélisation des mécanismes impliqués permettrait d'envisager de nouvelles thérapies.

La présence d'un xénobiotique peut se traduire par une augmentation du stress oxydant et donc une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). La molécule, Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), présente sous deux formes dans le modèle (non oxydée et oxydée) va être oxydée par les ROS. Keap1 a pour principal rôle d'éliminer la molécule Nrf2 en assurant son ubiquitination [46,47]. En l'absence d'oxydant, Nrf2 reste séquestrée dans le cytoplasme fixé au cytosquelette par Keap1 (Figure 4), et elle y est dégradée rapidement par le protéasome. Lorsque Keap1 est oxydée (que ce soit avant ou après sa liaison avec Nrf2), le complexe qu'elle forme avec Nrf2 est moins stable [47]. Ainsi en présence des ROS, une proportion plus importante de Nrf2 se retrouve sous forme libre et peut migrer librement dans le noyau. Une fois dans le noyau, Nrf2 se lie à la protéine Maf pour former le complexe Nrf2-Maf [48]. Ce complexe va ensuite se fixer sur les régions promotrices de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress

oxydant, et va induire leur transcription. Parmi ces protéines, on trouve la glutamate cystéine ligase, elle-même composée d'une sous unité régulatrice (GCLM) et d'une sous unité catalytique (GCLC), la glutathion synthétase (GS), la glutathion peroxydase (GPx), et le transporteur d'efflux MRP [46,48,72]. La GCLC, la GCLM et la GS sont impliquées dans la synthèse du GSH. La GPx détoxifie les ROS, en utilisant le GSH comme co-substrat.

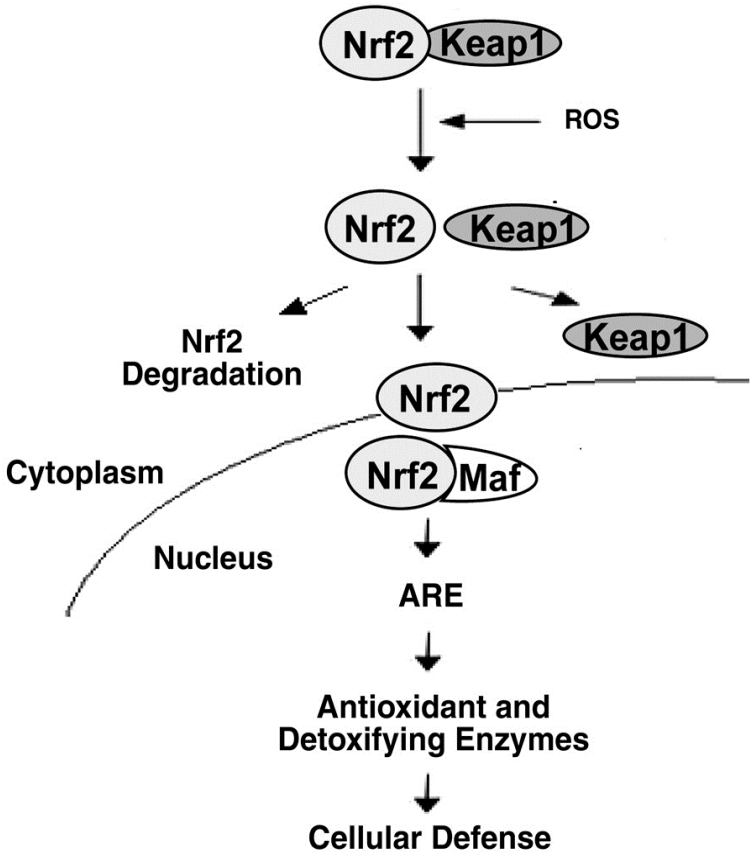


Figure 4 : Vue schématique et simplifiée de la voie de signalisation impliquant Nrf2 (d'après Kim *et al.* [1]).

Dans notre travail, nous avons choisi de nous intéresser à une partie de la voie de signalisation contrôlée par Nrf2 pour deux raisons principales. D'une part, c'est l'une des voies activée lors de la mise en contact de cellules proximales rénales avec des xénobiotiques [49] ; et d'autre part, c'est une voie primordiale de la réponse anti-oxydante, qui comprend l'induction de gènes impliqués dans la synthèse des enzymes de phase II (GSH par exemple) du métabolisme.

2.5. Méthodes statistiques bayésiennes pour la calibration de modèles complexes

L'analyse bayésienne permet d'établir des distributions de probabilités pour les valeurs de paramètres ou de prédictions d'un modèle, à partir d'informations *a priori* et de données expérimentales [2]. Une distribution de probabilité peut être définie comme une fonction associant les valeurs prises par une variable (dite aléatoire) à leur probabilité de réalisation.

Dans un contexte bayésien, toutes les quantités observables ou non-observables (rassemblées sous la notation θ) sont considérées comme des variables aléatoires et pour quantifier les incertitudes sur les valeurs de ces variables, on utilise des distributions de probabilité. Pour chaque variable, une distribution de probabilité *a priori*, $P(\theta)$, est définie. Cette distribution permet de définir les valeurs les plus plausibles (probables) ou un intervalle de valeurs possibles. Par l'intermédiaire du théorème de Bayes et en utilisant des données expérimentales (notées y), ces distributions sont ensuite actualisées conduisant à une distribution *a posteriori*, $P(\theta|y)$. Le théorème de Bayes indique que la distribution *a posteriori* des paramètres est proportionnelle au produit de toutes les distributions *a priori* $P(\theta)$, sous l'hypothèse habituelle d'indépendance *a priori* des paramètres, et de la vraisemblance des données $P(y|\theta)$, la probabilité des données conditionnellement aux paramètres. Soit :

$$P(\theta|y) = k.P(y|\theta)\prod P(\theta) \tag{13}$$

où k est une constante.

La vraisemblance $P(y|\theta)$ peut être définie par un modèle très simple, comme une loi normale de paramètres $\theta = (\mu, \sigma)$, où μ serait la moyenne et σ la déviation standard. Mais le plus souvent la vraisemblance est la combinaison complexe d'un modèle d'erreur expérimentale et d'une fonction de lien entre des paramètres physiques et une prédiction de la valeur moyenne des données. Les choix du modèle d'erreur et de la fonction de lien (modèle déterministe, par exemple un modèle PK) sont déterminants dans la forme de la vraisemblance. La distribution *a posteriori* intègre l'information *a priori* et celle contenue dans les données expérimentales et représente la connaissance que l'on peut avoir sur les paramètres, conditionnellement à la forme des modèles choisis. La détermination de cette loi *a posteriori* constitue l'estimation bayésienne des paramètres d'un modèle, encore appelée calibration. La distribution *a posteriori* conjointe est rarement définie par une expression analytique

explicite, mais l'utilisation des méthodes de Monte Carlo par chaînes de Markov, présentées dans la suite, permet de contourner cette difficulté.

La calibration bayésienne d'un modèle passe par la définition, pour chacun des paramètres du modèle, d'une distribution *a priori* qui doit refléter la connaissance sur ces paramètres, avant observation des données. Cette connaissance inclut, par exemple, des données *in vitro*, des informations référencées dans la littérature ou encore l'avis d'experts. Pour les paramètres, comme certains paramètres physiologiques (flux sanguins, etc), dont la valeur est déjà documentée, des distributions précises (informatives) peuvent être définies. En revanche, des distributions vagues (non-informatives) sont utilisées pour les paramètres dont les valeurs sont peu ou mal connues, tels que les coefficients de transfert entre deux compartiments non-physiologiques.

La calibration est l'étape suivante, et se fait à l'aide des données expérimentales. En l'absence d'une solution analytique, les techniques de simulations Monte Carlo par Chaînes de Markov (MCMC) peuvent être utilisées. Les simulations MCMC sont une classe particulière de simulations stochastiques. Les simulations Monte Carlo simples sont basées sur des tirages aléatoires successifs et indépendants issus de distributions *a priori*. Les tirages des MCMC sont influencés par les données expérimentales, et chaque tirage est conditionné par le précédent (et forment donc un processus markovien). De plus, les simulations MCMC ne requièrent que d'évaluer le produit défini par l'équation 13, sans la constante. Après un certain nombre d'itérations, la chaîne simulée converge en probabilité vers la densité *a posteriori* conjointe des paramètres du modèle [50]. En pratique, afin de vérifier la convergence des chaînes simulées, il est usuel de travailler sur plusieurs chaînes partant chacune d'un vecteur de paramètres différent. Pour déterminer si les différentes chaînes convergent vers le même ensemble de solutions, différents critères de convergence sont utilisés, tels que le critère de Gelman et Rubin [51]. Enfin, après convergence, il est possible d'estimer les distributions *a posteriori* des paramètres du modèle, en recueillant un échantillon suffisamment grand de valeurs simulées. Avant de discuter sur les valeurs et la distribution *a posteriori* des paramètres, le mode conjoint (vecteur de densité *a posteriori* la plus élevée) est souvent déterminé pour faire une première vérification du modèle [2 ,50].

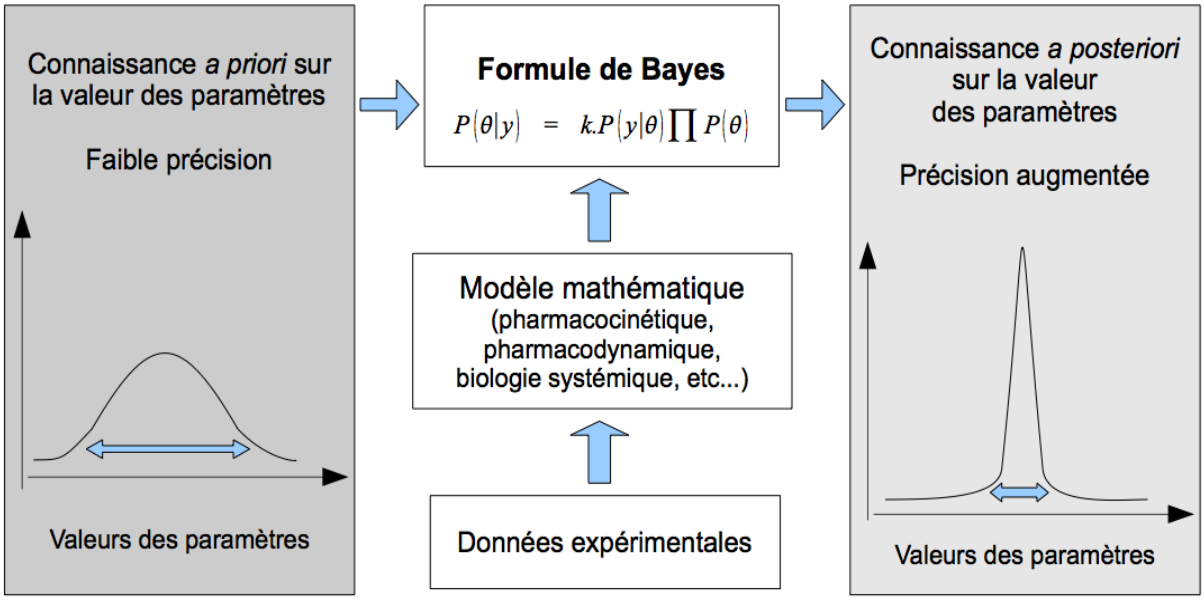


Figure 5 : Principe de la calibration bayésienne (d'après Micallef *et al.* [2]).

Les simulations MCMC permettent aussi d'obtenir la distribution marginale (ou individuelle) de chacun des paramètres, correspondant à leur densité de probabilité indépendamment des autres. Le fait d'obtenir une distribution marginale *a posteriori* moins diffuse que celle définie *a priori*, permet de dire que les données expérimentales ont pu informer sur la valeur du paramètre. À partir de ces distributions marginales, les statistiques descriptives (moyenne, l'écart type, quantiles, intervalles de crédibilité sous forme d'intervalles inter-quantiles) de chaque paramètre (individuel ou de population) du modèle peuvent être calculées. Ces distributions peuvent aussi être obtenues pour des prédictions du modèle ce qui permet d'en extraire, là aussi, les statistiques descriptives des prédictions. Les distributions *a posteriori* sont aussi utilisées lors des étapes ultérieures de vérification, validation ou comparaison de modèles.

2.6. Le projet européen PREDICT-IV

Les récents progrès réalisés dans les domaines de l'ingénierie tissulaire, de la biologie moléculaire, de la modélisation de la toxicité et en bioinformatique mènent à de nouvelles approches en matière d'intégration des tests de toxicité *in vitro* dans les premiers stades du développement des médicaments. Le projet européen PREDICT-IV, qui regroupe plusieurs organismes universitaires et professionnels, a pour but d'intégrer les techniques issues de ces récents progrès afin d'améliorer et optimiser les modèles de culture cellulaire réalisés dans le cadre de tests de toxicité. Une des finalités de ce projet est de caractériser la dynamique et la cinétique des

réponses cellulaires aux effets toxiques observés *in vitro*. Les organes les plus fréquemment touchés par la toxicité des médicaments, à savoir le foie et les reins, ont été prioritairement étudiés. Par ailleurs, le système nerveux, étant aussi une cible fréquente des effets indésirables des médicaments et étant moins documenté que les deux précédents organes, fut aussi inclus dans les études de toxicité. Le but de ce projet n'étant pas de développer de nouveaux modèles de culture cellulaire, pour chaque organe, le modèle cellulaire le plus approprié, retrouvé dans la littérature, a été utilisé et optimisé. Le projet européen PREDICT-IV vise à établir des protocoles de routine dans lesquels seuls des expérimentations *in vitro* seront faites et aucun test sur les animaux ne sera réalisé. Ce projet contribuera à l'identification des effets toxiques et à l'élucidation du mode d'action des composés nouveaux. La mise en place d'approches *in vitro*, aux dépens de l'utilisation des animaux dans les expérimentations, apportera une amélioration substantielle par rapport au principe des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Les résultats obtenus grâce à PREDICT-IV permettront aux industries pharmaceutiques de créer des tests spécifiques et sur-mesure afin d'évaluer, très tôt dans le développement des médicaments, leur toxicité. De plus, grâce à toutes les données récoltées, de nouveaux biomarqueurs plus spécifiques et plus simples à utiliser pourront être identifiés.

L'utilisation combinée de techniques *in vitro* et *in silico* visant à prédire la toxicité des médicaments pourrait remplacer certains tests réalisés actuellement *in vivo* chez l'animal et ainsi réduire considérablement le nombre d'expérimentations réalisées sur des animaux. Les principaux avantages de cette utilisation combinée *in vitro-in silico*, par rapport aux tests pré-cliniques réalisés sur des animaux, seraient les suivants :

- Réduction des coûts,
- Délais d'exécution plus rapides et tests automatisables,
- Diminution de la quantité en composé nécessaire pour les différents tests (toxicité et efficacité),
- Rejet plus rapide des molécules se révélant toxiques,
- Amélioration des connaissances concernant les voies de signalisation activées ou inhibées et donc concernant les potentielles utilisations thérapeutiques des molécules testées.

Tous les participants listés dans le Tableau 2 ont contribué au projet.

Tableau 2 : Liste des organismes participant au projet européen PREDICT-IV.

	P1 – University of Würzburg, Germany		P11 – University College Dublin, Ireland
	P2 – Merck KGaA, Darmstadt, Germany		P12 – University of Utrecht, Netherland
	P3 – Innsbruck Medical University, Austria		P13 – SimCyp Limited, Sheffield, United Kingdom
	P4 – Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy		P14 – Freie Universität Berlin, Germany
	P5 – Institut National de L'Environment Industriel et des Risques, Verneuil en Halatte, France		P16 – University of Lausanne, Switzerland
	P6 – ECVAM, Joint Research Centre, Ispra, Italy		P17 – Université d'Artois, Lens, France
	P7 – Emergentec Biodevelopment GmbH, Vienna, Austria		P18 – Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany
	P8 – Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland		P19 – Universität Rostock, Germany
	P9 – KaLy Cell, Besancon, France		P20 – NeuroProof GmbH, Rostock, Germany
	P10 – Université de Rennes 1, France		P21 – Paris-Lodron-Universität Salzburg, Austria

3. Matériel et méthodes

3.1. Données

3.1.1. Données survie cellulaire

Une étude de la survie cellulaire a été effectuée sur des cellules humaines proximales rénales issues de lignées non cancéreuses (RPTEC/TERT1) [52] afin de déterminer quelles concentrations seraient utilisées par la suite pour récolter les données de PK *in vitro* et les données omiques. Deux concentrations de CsA ont ainsi été sélectionnées. Une concentration à 5 µM (appelée « faible concentration » ou « LD » par la suite) et une concentration à 15 µM (appelée « forte concentration » ou « HD » par la suite). Que ce soit pour la faible concentration ou pour la forte concentration, aucune toxicité, en terme de survie cellulaire, n'a été observée.

3.1.2. Données PK vitro

Les conditions utilisées pour la culture cellulaire des RPTECs, et pour le dosage des quantités de CsA, et des données omiques qu'elles soient transcriptomiques (TCX), protéomiques (PTX) ou métabolomiques (MTX) sont décrites en détails dans l'article de Wilmes *et al.* [3]. Brièvement, les RPTECs ont été cultivées dans un milieu sans protéine plasmatique et n'ont pas été exposées à la CsA pendant 10 jours. Ces cellules ont ensuite été exposées à deux concentrations différentes de CsA (5 µM et 15 µM) administrées de façon répétée toutes les 24 heures pendant 14 jours. L'administration répétée consistait à échanger le milieu extracellulaire toutes les 24 heures. Trois essais différents ont été réalisés chacun en triple : un contrôle, un pour la faible concentration (5 µM) et un pour la forte concentration (15 µM).

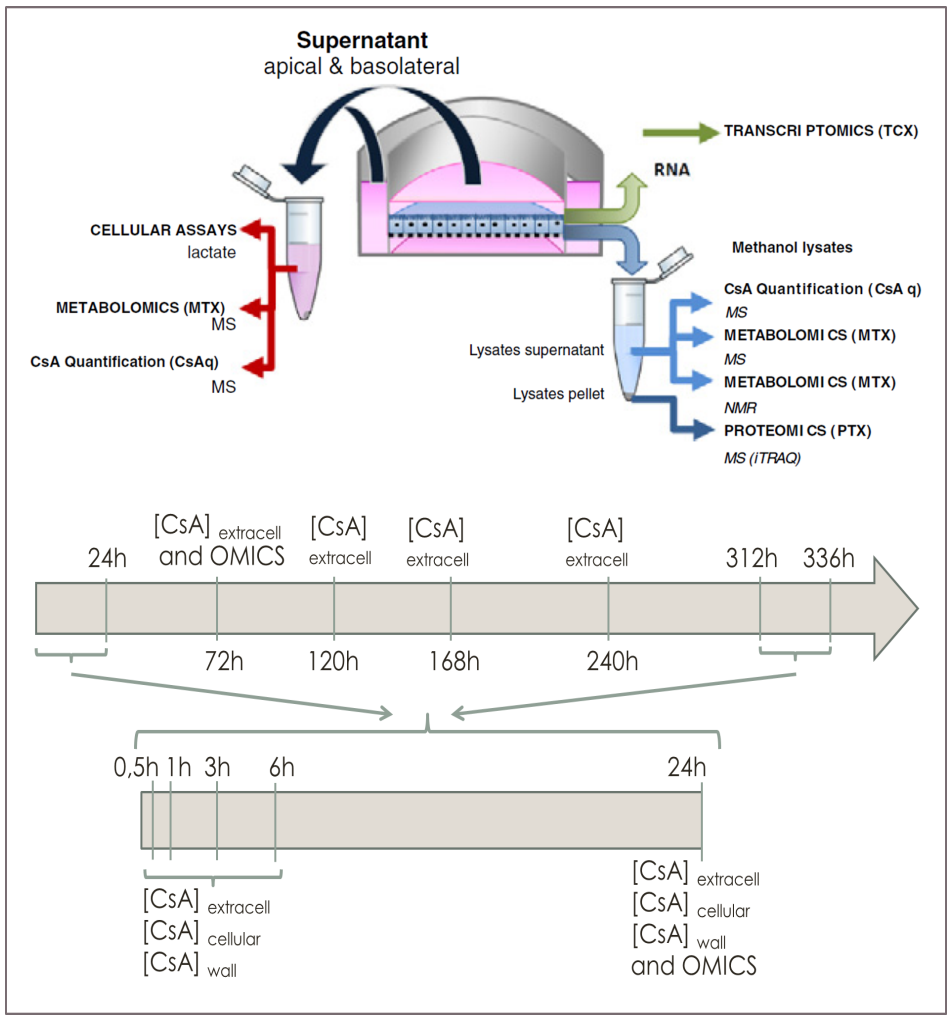


Figure 6 : Vue schématique du protocole utilisé pour les prélèvements des omiques, et de la CsA extracellulaire, intracellulaire, et adsorbée (d'après Wilmes *et al.* [3]).

Les concentrations de CsA ont été mesurées le premier et le 14ème jour aux temps 0.5h, 1h, 3h, 6h et 24h (juste avant le changement de milieu extracellulaire), et aux 3ème, 5ème, 7ème et 10ème jour à 24h (juste avant le changement de milieu extracellulaire). Les quantités intracellulaires et quantités adsorbées aux parois des puits ont été mesurées le premier et le 14ème jour aux mêmes temps (*cf.* Figure 6). Les quantités adsorbées aux parois des puits ont été récoltées en utilisant du méthanol comme éluant.

Les dosages pour les données de CsA ont été réalisés par spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie en phase liquide (LC-MS/MS). Les dosages pour les données transcriptomiques, réalisés par Illumina® HT 12 v3 BeadChip arrays, pour les données protéomiques, réalisés par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC-MS), et pour les données métabolomiques, réalisés par spectrométrie

de masse en infusion directe (MS), ont été faits sur des échantillons récoltés à la fin des jours 1, 3 et 14 (*cf.* Figure 6).

3.2. Modèles

3.2.1. Modèle de PK *in vitro*

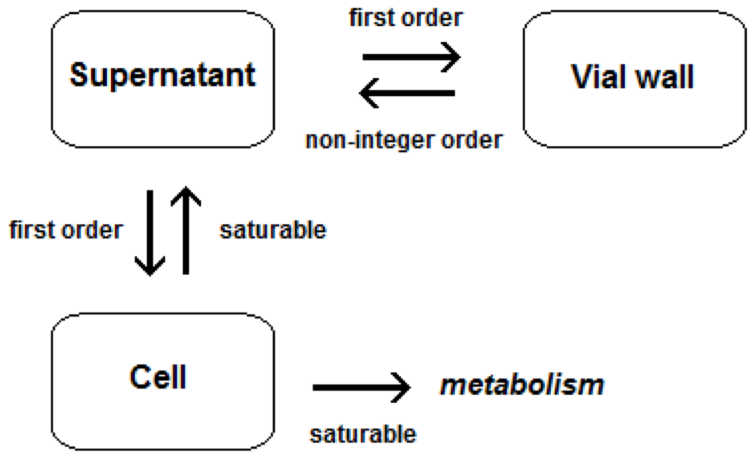


Figure 7 : Représentation schématique du modèle de PK *in vitro*.

Le modèle mathématique développé pour modéliser la distribution de la CsA dans les cellules RPECT est un modèle à trois compartiments (*cf.* Figure 7). Les trois compartiments sont : le milieu extracellulaire (qui correspond au surnageant seul), le milieu intracellulaire (qui correspond au lysat cellulaire) et les parois du puits. Les échanges de CsA se font entre le surnageant et les parois du puits et entre le surnageant et la cellule. Les échanges, se faisant du surnageant vers les parois du puits et du surnageant vers la cellule, sont modélisés par une équation linéaire (correspondant à un mécanisme non saturable). Les échanges se faisant des parois du puits vers le surnageant sont modélisés par une équation non linéaire de type puissance, et les échanges se faisant de la cellule vers le surnageant sont modélisés par une équation non linéaire de type Michaelis-Menten. Enfin, une composante d'élimination, qui correspond au métabolisme et qui est modélisée par une équation non linénaire de type Michaelis-Menten, est présente au niveau cellulaire. Les équations caractérisant ce modèle sont les suivantes :

$$\frac{\partial CsA_{cytosol}}{\partial t} = CL_{in_1}\frac{CsA_{extracellular}}{V_{extracellular}} - \frac{\frac{CL_{out_1}}{Km_{out_1}}\cdot\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}}}{1+\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}\cdot Km_{out_1}}} - \frac{v_{max}\cdot CsA_{cytosol}}{Km_2 + CsA_{cytosol}} \quad (14)$$

$$\frac{\partial CsA_{extracellular}}{\partial t} = -CL_{in_1}\frac{CsA_{extracellular}}{V_{extracellular}} + \frac{\frac{CL_{out_1}}{Km_{out_1}}\cdot\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}}}{1+\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}\cdot Km_{out_1}}} - k_1 . CsA_{extracellular} + k_2\left(CsA_{wall}\right)^{k_3} \quad (15)$$

$$\frac{\partial CsA_{wall}}{\partial t} = k_1 . CsA_{extracellular} - k_2\left(CsA_{wall}\right)^{k_3} \quad (16)$$

où $CsA_{cytosol}$ est la quantité de CsA dans le cytosol, $CsA_{extracellular}$, la quantité dans le milieu extracellulaire et CsA_{wall}, la quantité adsorbée aux parois du puits. La description des paramètres se trouve dans le Tableau 4 (*cf.* chapitre 4.Résultats).

3.2.2. Modèle Nrf2

Le modèle utilisé pour la partie biologie systémique est un modèle inspiré de celui de Zhang *et al.* [53] (*cf.* Figure 8). Toutes les équations sont regroupées dans les annexes. Le modèle de Zhang décrit les différentes phases du métabolisme d'un xénobiotique de façon détaillée, puisqu'il inclut l'activation et la transcription des gènes codant pour certaines molécules impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, ainsi que leur traduction. Le modèle est conçu de la manière suivante : lorsque le xénobiotique étudié entre dans la cellule, il peut entrer dans le noyau, être métabolisé par un cytochrome P450 (CYP), ou se lier au facteur de transcription AhR (cette liaison peut se faire aussi dans le noyau). Le complexe AhR-xénobiotique va se lier à la molécule ARNT pour former un nouveau complexe, qui va lui-même se lier à la région promotrice de certains gènes et induire leur transcription. La présence du xénobiotique étudié dans le cytoplasme va induire la production des ROS. Ces derniers vont avoir la même action sur Keap1 et le système Nrf2 que précédemment détaillée (*cf.* 2.4. La voie de signalisation Nrf2). Les ROS sont éliminées par conjugaison avec le GSH *via* la GPx et excrétées de la cellule *via* MRP. Le modèle de Zhang n'a pas été développé pour un xénobiotique spécifique mais pour une utilisation générique. Ainsi, des

modifications structurelles ont été apportées au modèle afin de mieux décrire la pharmacocinétique spécifique et le mode d'action spécifique de la CsA :

- Dans la cellule, la CsA est métabolisée par le cytochrome P450 3A5 (CYP3A5). Ce métabolite n'est pas suivi et n'a aucune incidence sur le modèle. Le choix de l'isoforme du CYP a été fait d'après les informations récoltées dans la littérature. En effet, la CsA est principalement métabolisée par les isoformes CYP3A [54], cependant, dans le rein, seul le CYP3A5 est significativement exprimé [55];
- Le stress oxydant, caractérisé par la quantité totale de tous les composés oxydants présents dans la cellule (ROS), est explicitement introduit dans le modèle comme une variable d'état (eq. A75);
- La production de ROS dépend de la quantité intracellulaire de CsA, et les ROS sont éliminées par conjugaison avec le GSH (eq. A75) en une espèce non réactive (NRS). NRS n'est pas suivi et n'a aucune incidence sur le modèle;
- Keap1 et le complexe Nrf2-Keap1 sont oxydés par les ROS (eqs. A52, A53, A72, A73).

Toutes les autres équations sont semblables à celles présentes dans le modèle de Zhang [53], cependant certaines valeurs de paramètres ont été modifiées du fait de la spécificité de la CsA : dans le modèle, les xénobiotiques peuvent se lier au récepteur nucléaire AhR. Néanmoins, la CsA n'est pas connue comme étant un ligand de AhR, ainsi les paramètres retrouvés dans l'équation caractérisant la liaison du xénobiotique (ici la CsA) avec AhR ont été fixés à zéro.

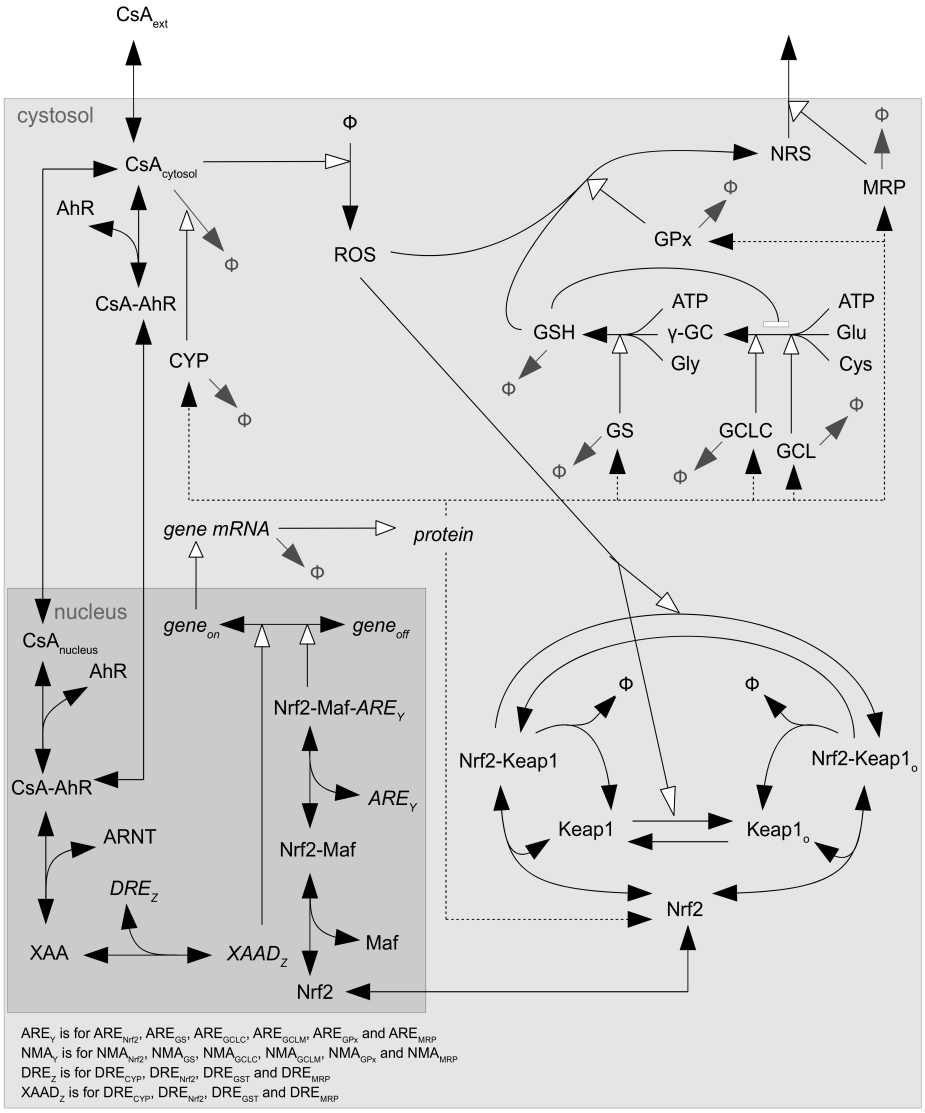


Figure 8 : Représentation schématique du modèle de biologie systémique Nrf2.

Par la suite, le couplage du modèle de signalisation cellulaire (partie biologie systémique) avec le modèle de distribution *in vitro* (partie PK *in vitro*) sera appelé modèle PKSB.

3.2.3. Modèle PBPK pour la CsA

Afin d'extrapoler les résultats obtenus à partir du modèle PKSB à une population humaine, un modèle PBPK a été utilisé. Le but ici est d'utiliser un modèle PBPK générique proposé par Simcyp pour la CsA chez l'homme, afin de reproduire les cinétiques observées par Gupta *et al.* [4] et de les extrapoler à une population plus large. La structure du modèle PBPK développé par Simcyp pour les humains est illustrée sur la Figure 9. Les modes d'administration sont la voie intraveineuse en bolus (« IV dose » sur la Figure) et la voie orale (« PO dose » sur la Figure). La voie cutanée et

l'inhalation sont également développées mais n'ont pas été utilisées pour les simulations de CsA présentées ici. Les sites du métabolisme de la CsA sont ici limités à l'intestin et au foie, et le seul site d'excrétion est le rein. L'évolution temporelle de la quantité ou de la concentration de la CsA dans chaque compartiment du modèle est obtenue en résolvant numériquement l'ensemble des équations différentielles correspondant au modèle.

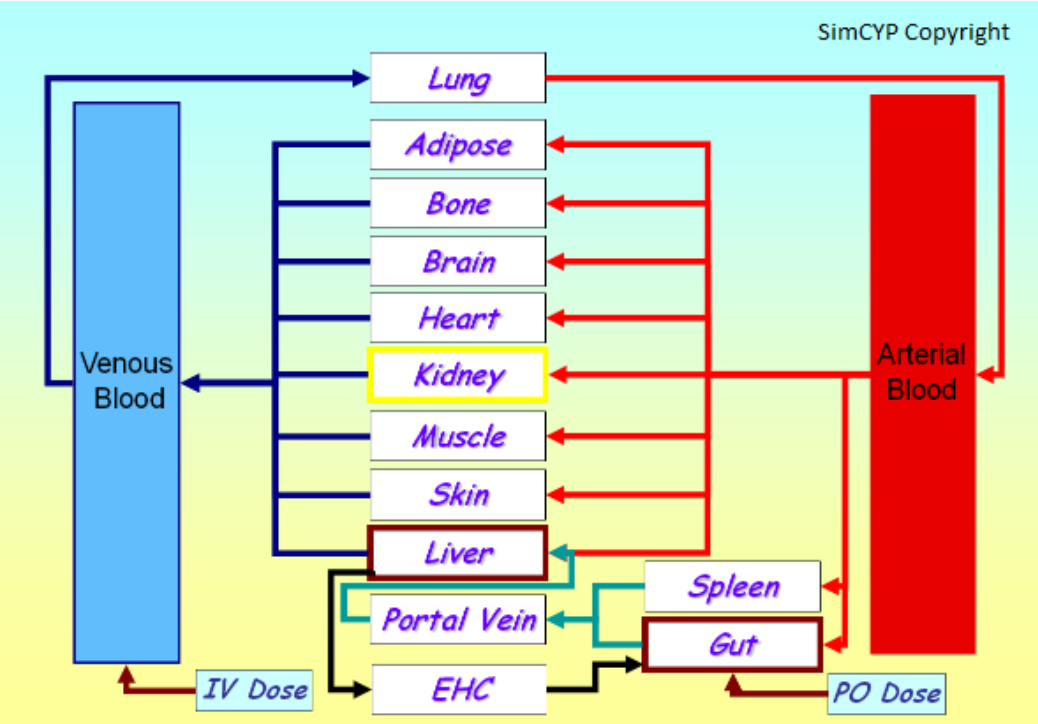


Figure 9 : Représentation schématique du modèle PBPK utilisé par Simcyp.

La structure du modèle est déjà codée dans le logiciel Simcyp, et seuls les paramètres doivent être déterminés. Concernant la population, le groupe prédéfini « volontaires sains » a été choisi. Toutefois pour correspondre aux caractéristiques des sujets étudiés par Gupta *et al.* [4], la masse de référence des sujets à échantillonner a été fixée à une moyenne de 64 kg, les âges minimum et maximum à 24 et 34 ans, et une proportion de 50% d'hommes. Des simulations Monte Carlo ont été réalisées afin de mettre en évidence et de modéliser la variabilité inter-individuelle. La durée de l'étude simulée était de 24 h pour une administration par voie orale de 10 mg / kg de CsA. Un modèle d'absorption orale de premier ordre a été utilisé, avec comme constante de vitesse 0,91 h^{-1} [56]. Enfin, la clairance *in vivo*, déjà définie dans Simcyp et égale à 59,8 $L.h^{-1}$, a été choisie.

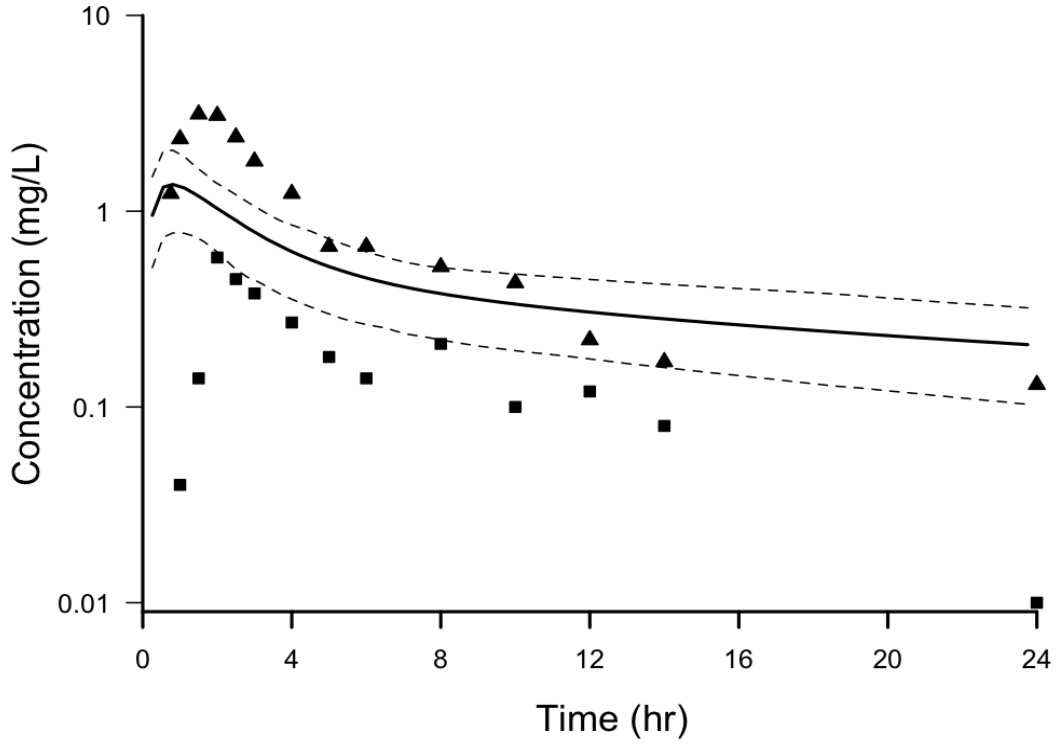


Figure 10 : Prédictions et données de la concentration en CsA dans le sang. Les données, provenant de Gupta *et al.* [4], ont été obtenues après une administration orale de 10 mg/kg de CsA , et sont représentées par des carrés pour les sujets ayant reçu un régime appauvri en matières grasses, et des triangles pour les sujets ayant reçu un régime enrichi en matières grasses. La ligne pleine correspond à la prédiction moyenne pour 100 sujets (alimentation non prise en compte) et les lignes en pointillés correspondent au 5ème et 95ème centiles des prédictions (d'après Bois *et al.* [5]).

La Figure 10 montre les données [4] superposées à la prédiction moyenne du modèle ainsi que les 5ème et 95ème centiles des valeurs simulées. L'évolution temporelle de la concentration de CsA dans le sang humain est assez bien décrite et ce, même si l'alimentation a un effet sur l'absorption du médicament. Des simulations plus détaillées sur le processus d'absorption seraient envisageables.

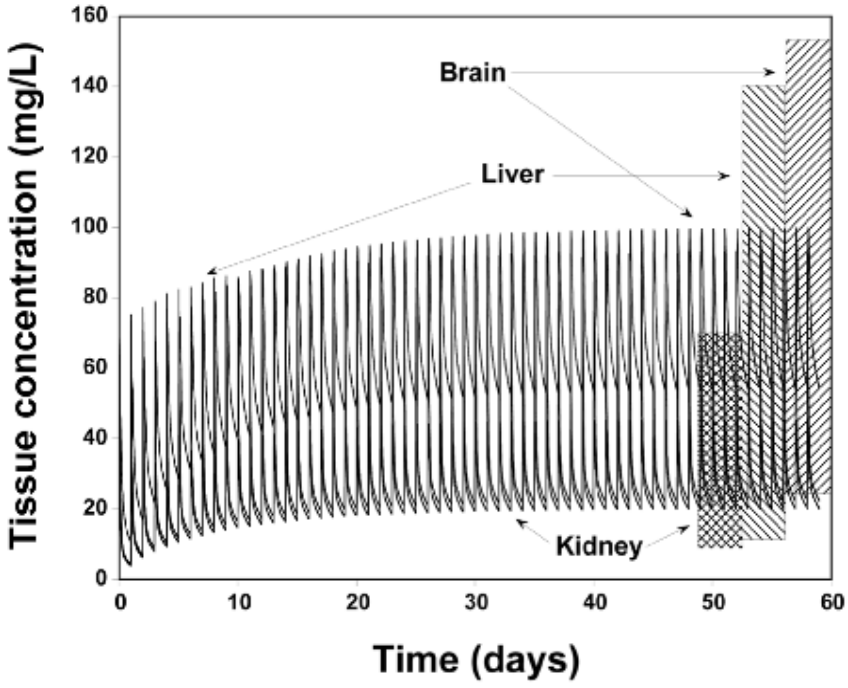


Figure 11 : Prédictions moyennes des concentrations de CsA dans le foie, le rein et le SNC (d'après Bois *et al.* [5]).

La Figure 11 illustre ce qui est probablement l'un des intérêts majeurs de l'utilisation des modèles PBPK : prédire l'évolution temporelle d'une substance (CsA dans ce cas) dans différents organes (ici dans le cerveau, le foie et les reins) pour une population humaine globale. Une centaine de sujets sains ont ainsi été simulés. Ces sujets sont âgés de 20 à 70 ans et ont pris une dose quotidienne de 10 mg/kg de CsA pendant 60 jours. Les autres paramètres ont été échantillonnés dans les mêmes distributions que celles utilisées pour la Figure 10. Il est intéressant de noter que lors de la première semaine de traitement, l'exposition au niveau du foie est la plus élevée des trois, alors qu'après 60 jours de traitement l'exposition au niveau du cerveau devient supérieure à celle du foie et du rein.

Enfin ce modèle a aussi été utilisé pour prédire des concentrations intracellulaires rénales qui ont été couplées au modèle PKSB présenté dans la partie précédente. Le couplage des concentrations intracellulaires rénales avec le modèle PKSB a été réalisé en utilisant deux méthodes différentes.

Pour la première méthode, le but recherché était de comparer l'évolution des quantités des différentes espèces du modèle PKSB au cours du temps pour différents sujets, en utilisant des

représentations graphiques de type « quantité en fonction du temps ». Ainsi, un ensemble de 100 sujets différents a été conçu. Chaque sujet est simulé de la même façon : une série temporelle de concentrations intracellulaires rénales a été simulée à l'aide du modèle PBPK et un vecteur de paramètres provenant du modèle PKSB a été attribué au sujet. Ce vecteur de paramètres est tiré au hasard parmi l'ensemble des vecteurs solutions (c'est-à-dire tiré par MCMC de la distribution conjointe *a posteriori* des paramètres).

Pour la deuxième méthode, le but recherché était d'utiliser un nombre important de prédictions afin d'étudier la distribution des quantités des différentes espèces du modèle PKSB à un instant *t*. Pour cette méthode, un ensemble de 10000 sujets différents a été simulé. Cent séries temporelles de concentrations intracellulaires rénales ont été simulées comme ci-dessus, et chacune a été appariée à 100 vecteurs de paramètres provenant du modèle PKSB tirés au hasard. Ainsi plusieurs sujets possèdent le même profil de concentrations intracellulaires. Il est cependant peu probable que deux sujets soient identiques (à la fois mêmes concentrations intracellulaires rénales et même vecteur de paramètres).

3.3. Méthodes statistiques

Les paramètres du modèle de PK *in vitro* ont été calibrés dans un cadre d'inférence bayésienne [50,57], avec les données expérimentales sur les quantités de CsA extracellulaires, intracellulaires et adsorbées. Une distribution non informative (vague) a été utilisée pour définir la distribution *a priori* des paramètres (voir Tableau 3). La vraisemblance des données a été choisie comme suivant une distribution log-normale centrée sur les prédictions du modèle. L'écart type correspondant aux erreurs de mesures a été choisi comme étant spécifique de chaque type de données (extracellulaires, intracellulaires, et adsorption), ainsi trois écarts types différents ont été estimés. Une distribution non informative de type log-uniforme leur a été assignée et ils ont été calibrés en même temps que les autres paramètres du modèle. Un total de 11 paramètres (dont 3 statistiques) ont été calibrés. Les distributions *a posteriori* des paramètres ont été obtenues par échantillonnages MCMC [57].

Pour le modèle PKSB, 27 paramètres (dont 4 statistiques) ont été calibrés. Mis à part la vitesse maximale de métabolisme (vmax) de la CsA, tous les paramètres préalablement estimés dans le modèle PK *in vitro* ont été fixés à leur mode *a posteriori* dans le modèle PKSB. Le vmax du métabolisme de la CsA n'a pas exactement la même signification ni les mêmes unités dans les deux modèles. De plus, une simple transposition n'a pas été possible car une variable d'état doit être

utilisée pour la conversion, ce qui rend le calcul complexe (car dépendant du temps). Ainsi pour simplifier la résolution du système, ce paramètre a été de nouveau estimé dans le modèle PKSB. C'est pour cette même raison que les données sur les quantités de CsA extracellulaire, intracellulaire et adsorbée sont utilisées, et que les écarts types correspondant aux erreurs de mesure sur ces quantités sont conservés. Les 23 paramètres non statistiques (Tableau 4) ont été calibrés en utilisant les données omiques, présentées sous forme de *fold change*. Les données omiques utilisées concernent les ARNm, protéines et molécules suivantes : ARN messager (ARNm) du gène codant pour Nrf2, ARNm du CYP3A5, ARNm de la GS, ARNm de la GCLC, ARNm de la GCLM, ARNm de la GPx, ARNm de la MRP, la protéine GCLM, la GS, la MRP, la γ-glutamylcysteine (γ-GC), et le GSH (*cf.* Annexes). Sept de ces 23 paramètres ont une influence directe sur la formation et l'élimination des ROS, ainsi que sur son action sur Keap1. Quinze de ces 23 paramètres contrôlent l'activation et l'induction des gènes suivants : Nrf2, GCLC, GCLM, GPx, CYP3A5, GS et MRP. Les distributions *a priori* des paramètres ont été choisies comme étant vagues (pour deux paramètres spécifiques de la CsA) ou centrées (pour 21 autres paramètres) sur les valeurs utilisées par Zhang [53] (Tableau 4). La vraisemblance des données a été choisie comme suivant une distribution log-normale centrée sur les prédictions du modèle. Un unique écart-type correspondant à l'erreur sur les mesures a été choisi, et calibré en même temps que les autres paramètres du modèle, en utilisant une distribution *a priori* vague de type log-uniforme. Comme pour la calibration des paramètres du modèle PK *in vitro*, les distributions *a posteriori* des paramètres ont été obtenues en utilisant un échantillonnage MCMC. Pour tous les paramètres, la convergence a été évaluée en calculant le critère $\hat{R}$ de Gelman et Rubin [51] sur les 200,000 dernières itérations de chaque chaine.

Les simulations permettant la calibration des paramètres et celles pour réaliser des prédictions ont été réalisées avec GNU MCSim v5.4.0 [57]. Le logiciel R, version 2.15.1 [58] a été utilisé pour la réalisation de tous les graphiques.

Tableau 3 : Liste des paramètres calibrés du modèle PKSB, et de leur distribution *a priori*.

Paramètre	*Description*	*Unités*	*Distribution* a priori
v_{max_7}	Constante de vitesse du métabolisme de la CsA	sec^{-1}	*LN*(0.2,2)
$k_{f_{75}}$	Vitesse de formation de base des ROS	$zmol.sec^{-1}$	*LN*(12,2)
$v_{max_{8b}}$	Vitesse maximum du métabolisme des ROS	sec^{-1}	*LN*(8, 2)
$k_{ox_{10}}$	Constante de vitesse de l'oxydation de Keap1	$zmol^{-1}.sec^{-1}$	*Uniforme*(10^{-8},10^{-2})
k_{ROS}	Constante de vitesse de formation des ROS	sec^{-1}	*Uniforme*(10^{-8},10^{-2})
$k_{b_{18}}$	Constante de vitesse de liaison entre Nrf2 et Maf	sec^{-1}	*LN*(0.003,2)
$k_{TSP_{21}}$	Constante de vitesse de transcription de $mRNA_{CYP}$	sec^{-1}	*LN*(1.07,2)
$k_{TSP_{28}}$	Constante de vitesse de transcription de $mRNA_{Nrf2}$	sec^{-1}	*LN*(0.00611,2)
$k_{TSP_{34}}$	Constante de vitesse de transcription de $mRNA_{GS}$	sec^{-1}	*LN*(1.15,2)
$k_{TSP_{42}}$	Constante de vitesse de transcription de $mRNA_{GCLC}$	sec^{-1}	*LN*(1.98,2)
$k_{TSP_{48}}$	Constante de vitesse de transcription de $mRNA_{GCLM}$	sec^{-1}	*LN*(3.22,2)
$k_{TSP_{57}}$	Constante de vitesse de transcription de $mRNA_{GPx}$	sec^{-1}	*LN*(0.242,2)
$k_{TSP_{66}}$	Constante de vitesse de transcription de $mRNA_{MRP}$	sec^{-1}	*LN*(0.9,2)
$k_{b_{52}}$	Constante de vitesse de liaison entre GCLC et GCLM	sec^{-1}	*LN*(2×10^{-5},2)
$k_{ind(NMA)_{27}}$	Coefficient d'induction pour le gène Nrf2	$zmol^{-1}.sec^{-1}$	*LN*(100, 2)
$k_{ind(NMA)_{33}}$	Coefficient d'induction pour le gène GS	$zmol^{-1}.sec^{-1}$	*LN*(5.95, 2)
$k_{ind(NMA)_{41}}$	Coefficient d'induction pour le gène GCLC	$zmol^{-1}.sec^{-1}$	*LN*(8.7, 2)
$k_{ind(NMA)_{47}}$	Coefficient d'induction pour le gène GCLM	$zmol^{-1}.sec^{-1}$	*LN*(1.6, 2)
$k_{ind(NMA)_{56}}$	Coefficient d'induction pour le gène GPx	$zmol^{-1}.sec^{-1}$	*LN*(11.9, 2)
$k_{ind(NMA)_{65}}$	Coefficient d'induction pour le gène MRP	$zmol^{-1}.sec^{-1}$	*LN*(16, 2)
$v_{max(GCL)_{72}}$	Constante de vitesse de la synthèse de γ-GC	sec^{-1}	*LN*(8.2, 2)
$v_{max(GCLC)_{72}}$	Constante de vitesse de la synthèse de γ-GC	sec^{-1}	*LN*(1.9, 2)
$v_{max_{73}}$	Constante de vitesse de la synthèse de GSH	sec^{-1}	*LN*(6.5, 2)

LN: Distribution log-normale (moyenne, écart-type)

4. Résultats

4.1. Modèle PK in vitro

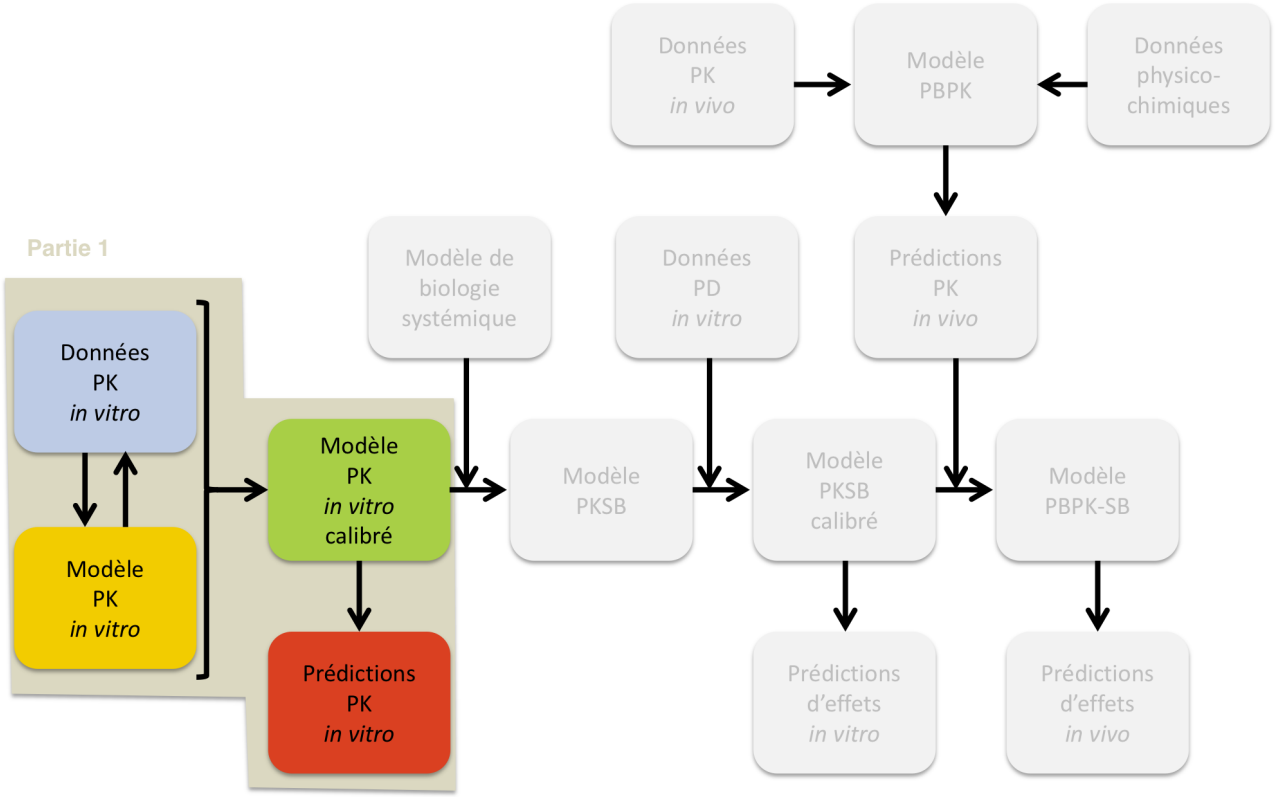


Figure 12 : Présentation schématique des différentes étapes de la partie concernant le modèle PK *in vitro* (Partie 1).

Les résultats de la calibration du modèle PK sur la base des données de concentration obtenues *in vitro* sont illustrés sur la Figure 13. Dans l'ensemble, les données sont plutôt bien simulées. Le profil journalier de la cinétique de la CsA administrée à 5 µM (« faible concentration ») ne montre pas d'altérations particulières entre le jour 1 et le jour 14, et l'état d'équilibre est rapidement atteint au bout de trois jours. Les données révèlent une augmentation d'un facteur de seulement 1,5 entre les quantités intracellulaires de CsA au jour 1 et celles au jour 14. Ce rapport est confirmé et conservé par les prédictions. Le rapport moyen entre les concentrations intracellulaires et extracellulaires de CsA est d'environ 200 au jour 14. Cela concorde avec le fait

que la CSA est très lipophile et a tendance à s'accumuler dans les cellules. L'adsorption de la CsA aux parois des puits suit le même profil que la distribution intracellulaire. A l'état d'équilibre, la répartition de la CsA dans les différents « compartiments » est la suivante : environ 67% de la quantité totale dans le surnageant, 21% dans les cellules et 12% adsorbée aux parois des puits. Enfin, 30% de la quantité totale de CsA administrée au cours des 14 jours a été métabolisée.

Le profil journalier de la cinétique de la CsA administrée à 15 µM (« forte concentration ») montre d'importantes modifications dans la cinétique entre le jour 1 et le jour 14. Contrairement à la faible concentration, l'état d'équilibre n'est pas clairement identifiable au bout de 14 jours. Des simulations réalisées sur 60 jours (Figure 14) permettent d'établir que l'équilibre est atteint au bout de 15 jours environ, soit beaucoup plus tardivement qu'à faible concentration. A l'état d'équilibre, la répartition de la CsA dans les différents « compartiments » est la suivante : environ 48% de la quantité totale dans le surnageant, 43% dans les cellules et 9% adsorbée aux parois des puits. Là aussi, les résultats sont fortement différents de ceux rencontrés pour la faible concentration. Cette différence se retrouve principalement dans l'étude des quantités intracellulaires de CsA. Par rapport au jour 1, la quantité retrouvée dans les cellules est 3 fois plus importante au jour 14 (alors qu'elle était 1,5 fois plus importante pour la faible concentration), et le rapport moyen entre les concentrations intracellulaires et extracellulaires de CsA au jour 14 est de 650 (contre 200 pour la faible concentration). Ceci met en évidence la présence d'un ou plusieurs mécanismes de distribution saturables. En effet, l'existence de ce type de mécanisme permettrait d'expliquer cette accumulation non linéaire de CsA dans les cellules. Un élément important à noter est qu'il n'aurait pas été possible de retrouver ce phénomène si le protocole expérimental n'avait pas inclus une administration à doses répétées. Enfin, 15% de la quantité totale de CsA administrée au cours des 14 jours a été métabolisée. Cette valeur plus faible qu'à la faible concentration est cohérente avec l'hypothèse d'un métabolisme saturable.

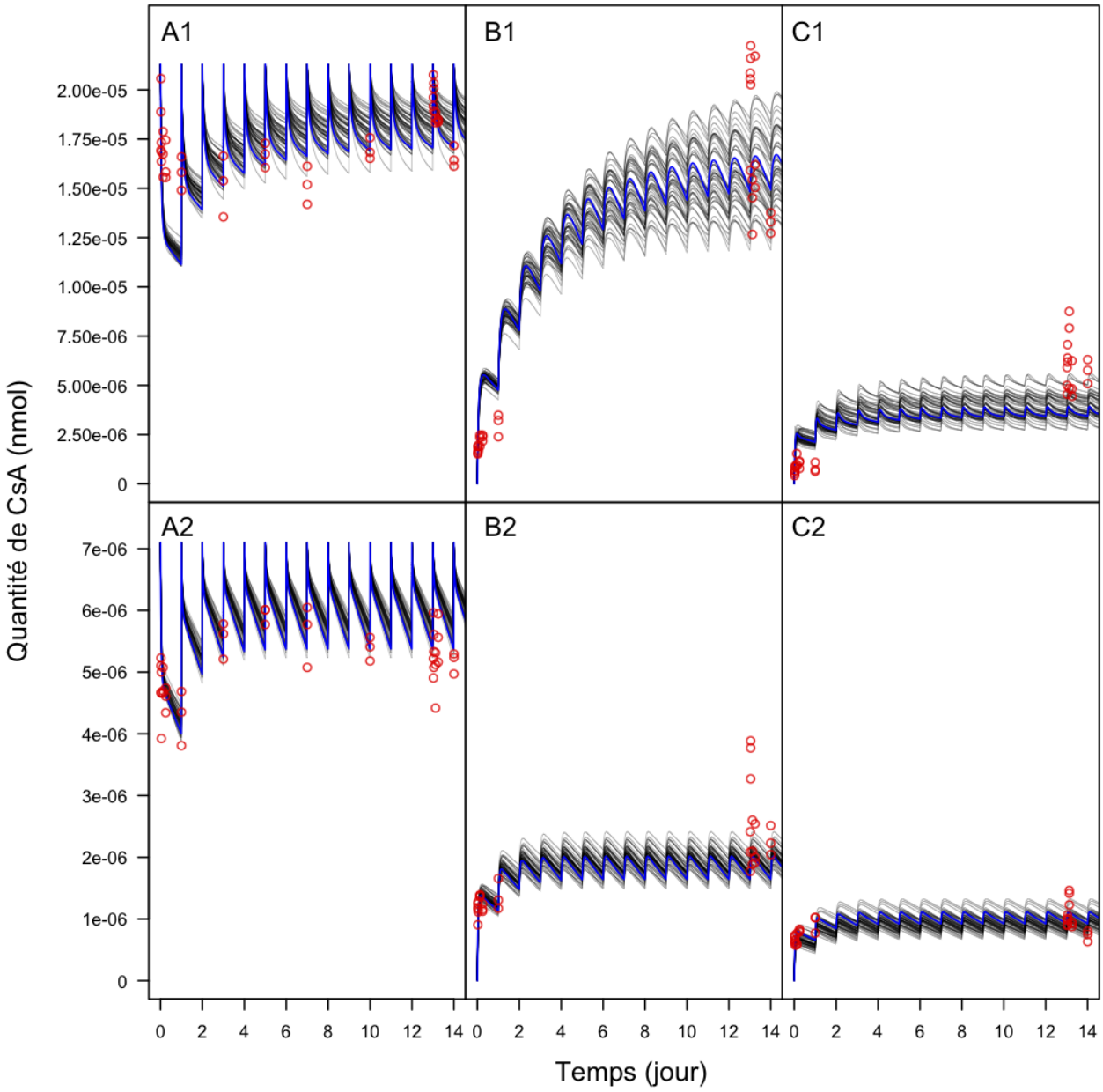


Figure 13 : Représentation graphique des quantités extracellulaires (A1 et A2), intracellulaires (B1 et B2) et adsorbées (C1 et C2) en CsA en fonction du temps (sur 14 jours). Les résultats obtenus pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM sont représentés en haut (A1, B1 et C1), et les résultats obtenus pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM sont représentés en bas (A2, B2 et C2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*. Les cercles rouges représentent les données.

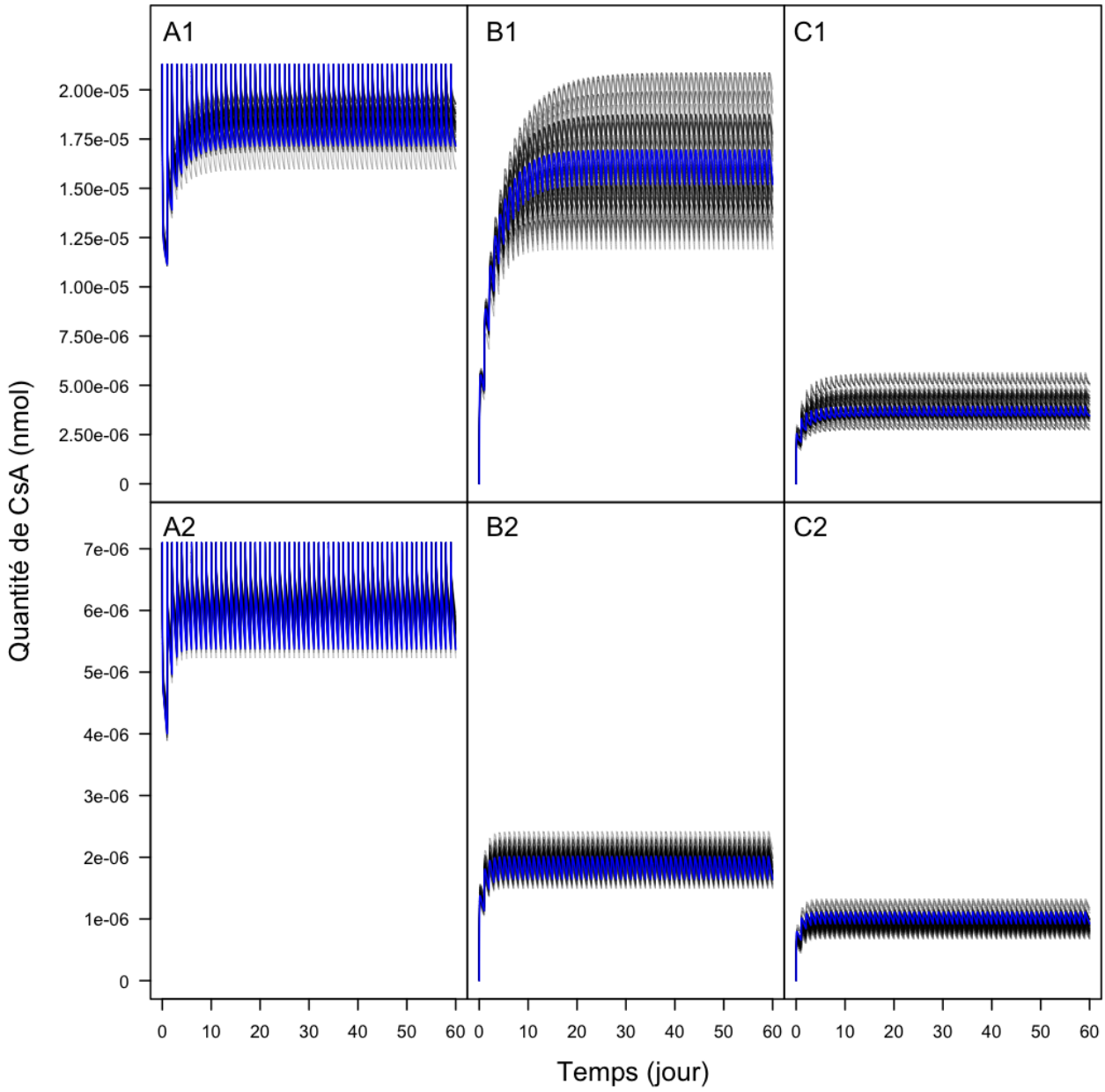


Figure 14 : Représentation graphique des quantités extracellulaires (A1 et A2), intracellulaires (B1 et B2) et adsorbées (C1 et C2) en CsA en fonction du temps (sur 60 jours). Les résultats obtenus pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM sont représentés en bas (A2, B2 et C2), et les résultats obtenus pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM sont représentés en haut (A1, B1 et C1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

Tableau 4 : Liste des paramètres du modèle PK *in vitro*, et de leurs distributions statistiques.

Paramètre	*Description*	*Unités*	*Distribution* a priori	*Mode, moyenne ± écart-type de la distribution* a posteriori
CL_{in_1}	Constante de diffusion pour l'entrée dans la cellule	$\mu m^3.sec^{-1}$	$LU^{**}(10^{-1}, 10^4)$	99.6, 99.8 ± 21
Km_{out_1}	Constante de Michaelis pour l'efflux cellulaire	$\mu mol.L^{-1}$	$LU(100, 50000)$	2965, 3160 ± 620
$\frac{CL_{out_1}}{Km_{out_1}}$	Rapport entre les constantes de Michaelis et de diffusion de l'efflux cellulaire	$\mu m^3.sec^{-1}$	$LU(10^{-2}, 20)$	0.581, 0.568 ± 0.16
k_1	Constante de vitesse de liaison au plastique	sec^{-1}	$LU(10^{-6}, 5\times10^{-4})$	3.55×10^{-5}, $3.54\times10^{-5} \pm 1.0\times10^{-5}$
k_3	Coefficient de détachement	-	Uniforme(0, 0.95)	0.921, 0.802 ± 0.074
k_2	Constante de vitesse de détachement au plastique	$zmol^{(1-k3)*}.sec^{-1}$	$LU(10^{-4}, 0.5)$	6.01×10^{-4}, $6.09\times10^{-3} \pm 8.7\times10^{-3}$
v_{max}	Vitesse maximum du métabolisme de la CsA	$zmol.sec^{-1}$	$LU(0.1, 5000)$	40.0, 47.2 ± 14
K_{m_2}	Constante de Michealis pour le métabolisme intracellulaire	zmol	$LU(5\times10^5, 5\times10^7)$	2.18×10^6, $3.43\times10^6 \pm 2.2\times10^6$
V_{cell}	Volume cellulaire	μm^3	Uniforme(500, 3000)	2081, 2010 ± 140

*: 1 zmol = 1 zeptomole = 10^{-21} mol

**: *LU*: Distribution log-uniforme (borne inférieure, borne supérieure).

4.2. Modèle PKSB (couplage du modèle PK in vitro *et d'un modèle Nrf2)*

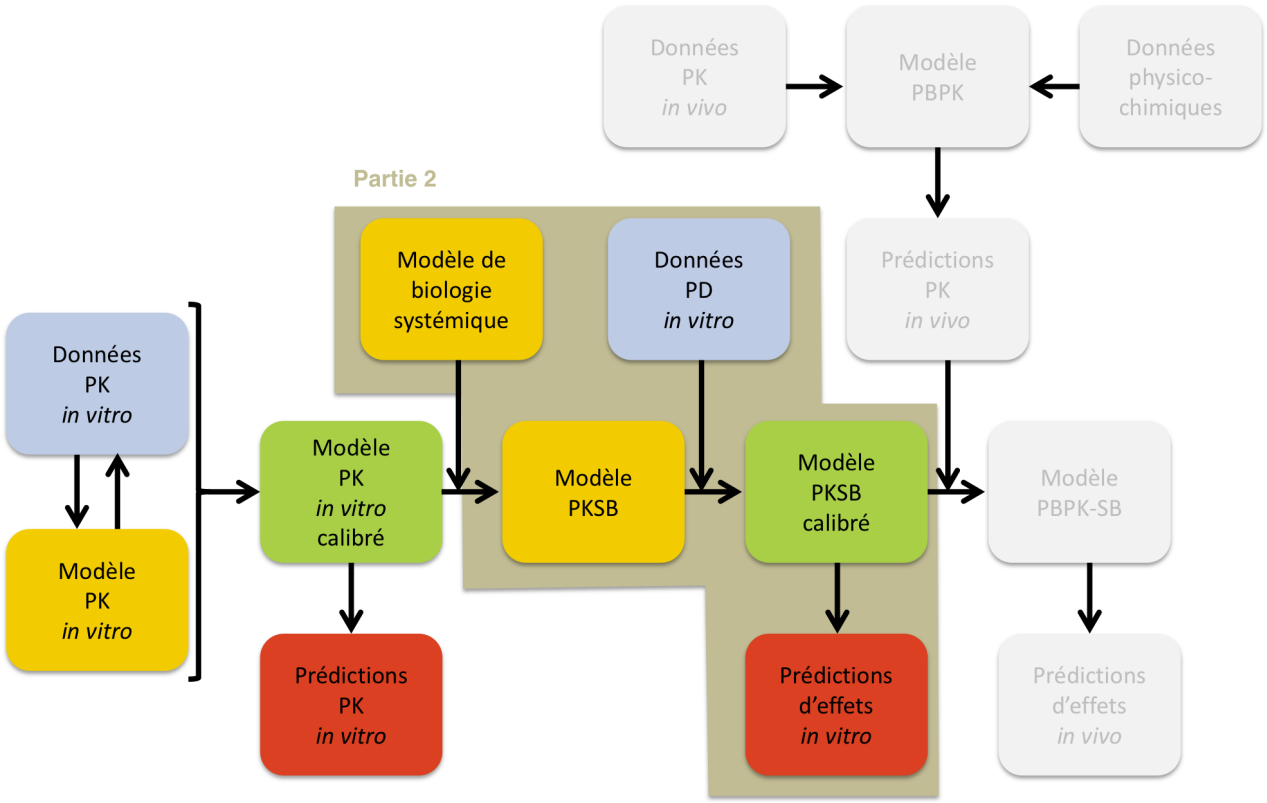


Figure 15 : Présentation schématique des différentes étapes de la partie concernant le modèle PKSB (Partie 2).

Une grande partie des résultats présentés ici (et des données utilisées) le sont sous forme de rapport entre deux quantités (ou « fold change » en anglais). Tous les rapports des quantités, utilisés dans ce document, et appelés par la suite FC, sont calculés de la même façon. Ils correspondent au rapport entre la quantité d'une espèce (GSH, GCLC, GCLM, etc...) à un temps t pour une concentration donnée en CsA administrée, sur la quantité de cette même espèce, au même temps t, mais à une concentration en CsA administrée égale à zéro.

Les résultats concernant les prédictions des omiques et des ROS en fonction du temps présentent plusieurs particularités intéressantes. Tout d'abord, après étude et comparaison de l'évolution des différentes chaines de simulation MCMC, deux ensembles de solutions différents ont

pu être définis. Il n'est pas évident de déterminer lequel des deux ensembles de solutions est le plus probable ou le plus correct car ils possèdent tous les deux des avantages comme des inconvénients et aucun ne présente plus d'éléments en sa faveur que l'autre. Dans le premier cas, la densité *a posteriori* globale se stabilise à un niveau légèrement plus élevé que dans le second cas. Dans le second cas, l'erreur prédite associée aux données est en général plus faible. De plus, aux vues des prédictions, il est, là aussi, difficile de départager les deux ensembles de solutions. Aussi, les deux ensembles de solutions seront présentés et détaillés et toutes les prédictions (en fonction du temps et de la dose) ont été réalisés pour chacun des deux ensembles de solutions. Le premier ensemble de solution sera nommé PES par la suite, et le second ensemble SES.

Pour le premier ensemble de solutions, quatre MCMC ont été utilisées, et pour le second ensemble de solutions, cinq MCMC ont été utilisées. La convergence de ces neuf MCMC a été obtenue après 200,000 itérations. Pour chaque ensemble de solutions, un échantillon de 5000 vecteurs de paramètres a été créé pour réaliser toutes les prédictions. Les Figures 16 à 31 concernent le premier ensemble de solutions et les Figures 32 à 49 concernent le deuxième ensemble de solutions.

Tableau 5 : Liste des paramètres calibrés du modèle PKSB, et de leur distribution *a posteriori*.

Paramètre	*Mode, moyenne ± écart-type de la distribution* a posteriori *(pour l'ensemble de solutions 1)*	*Mode, moyenne ± écart-type de la distribution* a posteriori *(pour l'ensemble de solutions 2)*
v_{max_7}	0.193, 0.245 ± 0.125	0.200, 0.273 ± 0.11
$k_{f_{75}}$	16.6, 37.6 ± 21.5	24.8, 34.3 ± 11.4
$v_{max_{8b}}$	13.3, 16.4 ± 9.8	13.2, 20.4 ± 12.2
$k_{ox_{10}}$	3.07×10^{-6}, $3.86\times10^{-6} \pm 2.0\times10^{-6}$	2.02×10^{-6}, $1.97\times10^{-6} \pm 1.86\times10^{-7}$
k_{ROS}	6.80×10^{-5}, $6.69\times10^{-5} \pm 2.42\times10^{-5}$	3.18×10^{-5}, $2.94\times10^{-5} \pm 2.98\times10^{-6}$
$k_{b_{18}}$	0.022, 0.0166 ± 0.010	0.0182, 0.0121 ± 0.00476
$k_{TSP_{21}}$	1.22, 1.26 ± 0.633	1.31, 1.11 ± 0.484
$k_{TSP_{28}}$	0.039, 0.060 ± 0.042	0.034, 0.053 ± 0.017
$k_{TSP_{34}}$	1.14, 2.06 ± 0.964	2.0, 5.5 ± 2.34
$k_{TSP_{42}}$	0.836, 1.19 ± 0.633	1.16, 0.935 ± 0.405
$k_{TSP_{48}}$	2.81, 3.66 ± 2.31	2.67, 3.51 ± 1.93
$k_{TSP_{57}}$	0.513, 0.532 ± 0.187	0.592, 0.533 ± 0.162
$k_{TSP_{66}}$	0.438, 1.35 ± 1.06	0.585, 1.28 ± 1.03
$k_{b_{52}}$	1.76×10^{-6}, $1.57\times10^{-5} \pm 9.03\times10^{-6}$	7.82×10^{-6}, $1.36\times10^{-5} \pm 8.54\times10^{-6}$
$k_{ind(NMA)_{27}}$	151, 199 ± 158	246, 239 ± 179
$k_{ind(NMA)_{33}}$	3.40, 4.84 ± 2.39	1.54, 4.31 ± 2.13
$k_{ind(NMA)_{41}}$	40, 32 ± 12	55.4, 69.8 ± 22.3
$k_{ind(NMA)_{47}}$	2.79, 4.32 ± 1.56	9.12, 8.93 ± 2.80
$k_{ind(NMA)_{56}}$	13.2, 16.2 ± 10.1	44.7, 60.9 ± 25.6
$k_{ind(NMA)_{65}}$	6.01, 12.1 ± 7.17	5.66, 15.9 ± 9.88
$v_{max(GCL)_{72}}$	15.6, 20.9 ± 12.1	17.4, 18.8 ± 11.3
$v_{max(GCLC)_{72}}$	0.795, 0.918 ± 0.552	0.38, 0.666 ± 0.369
$v_{max_{73}}$	13.3, 8.06 ± 4.48	7.78, 2.98 ± 0.369

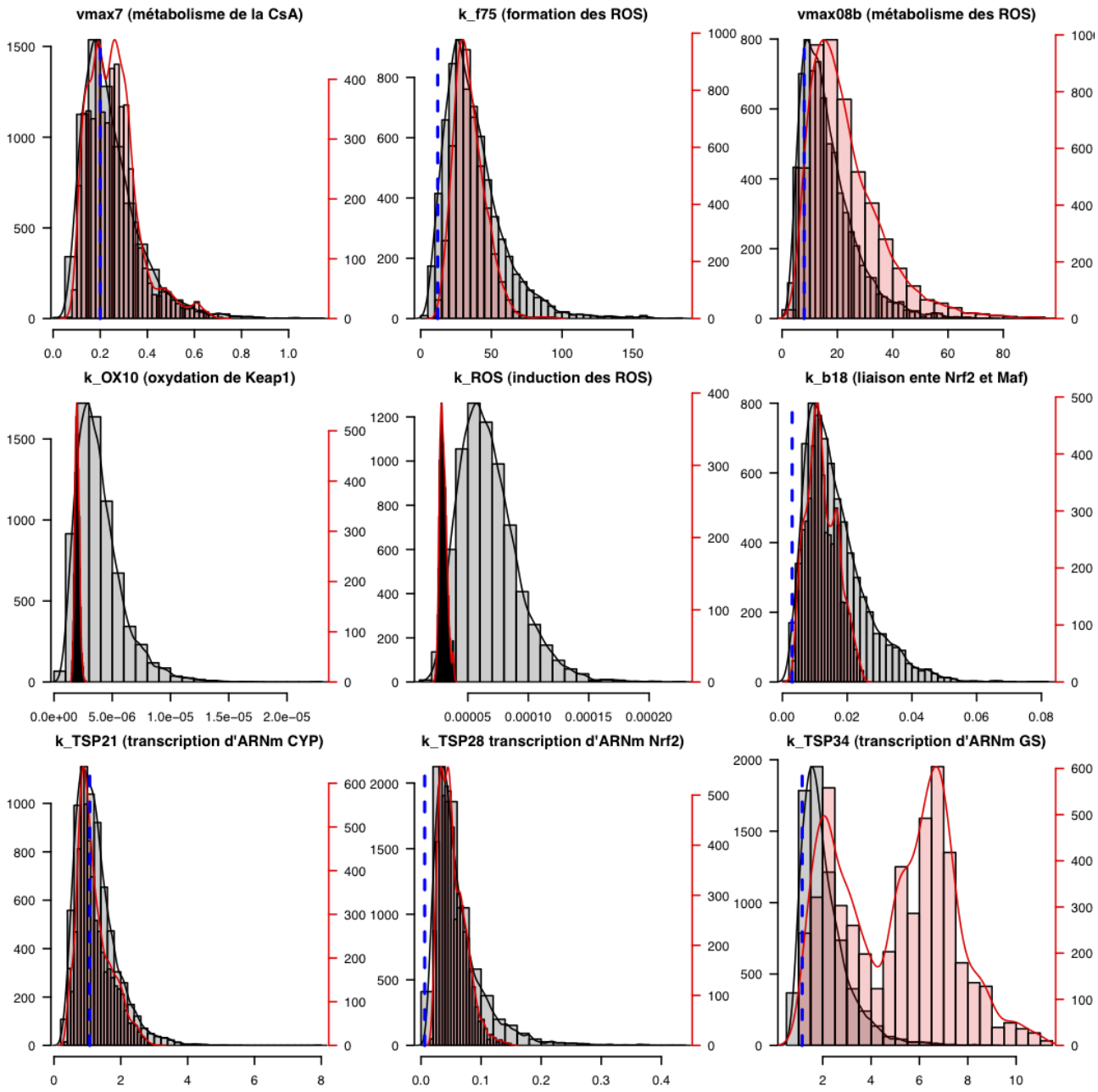


Figure 16a : Distributions des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions (en noir) et pour le second ensemble de solutions (en rouge). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution *a priori*.

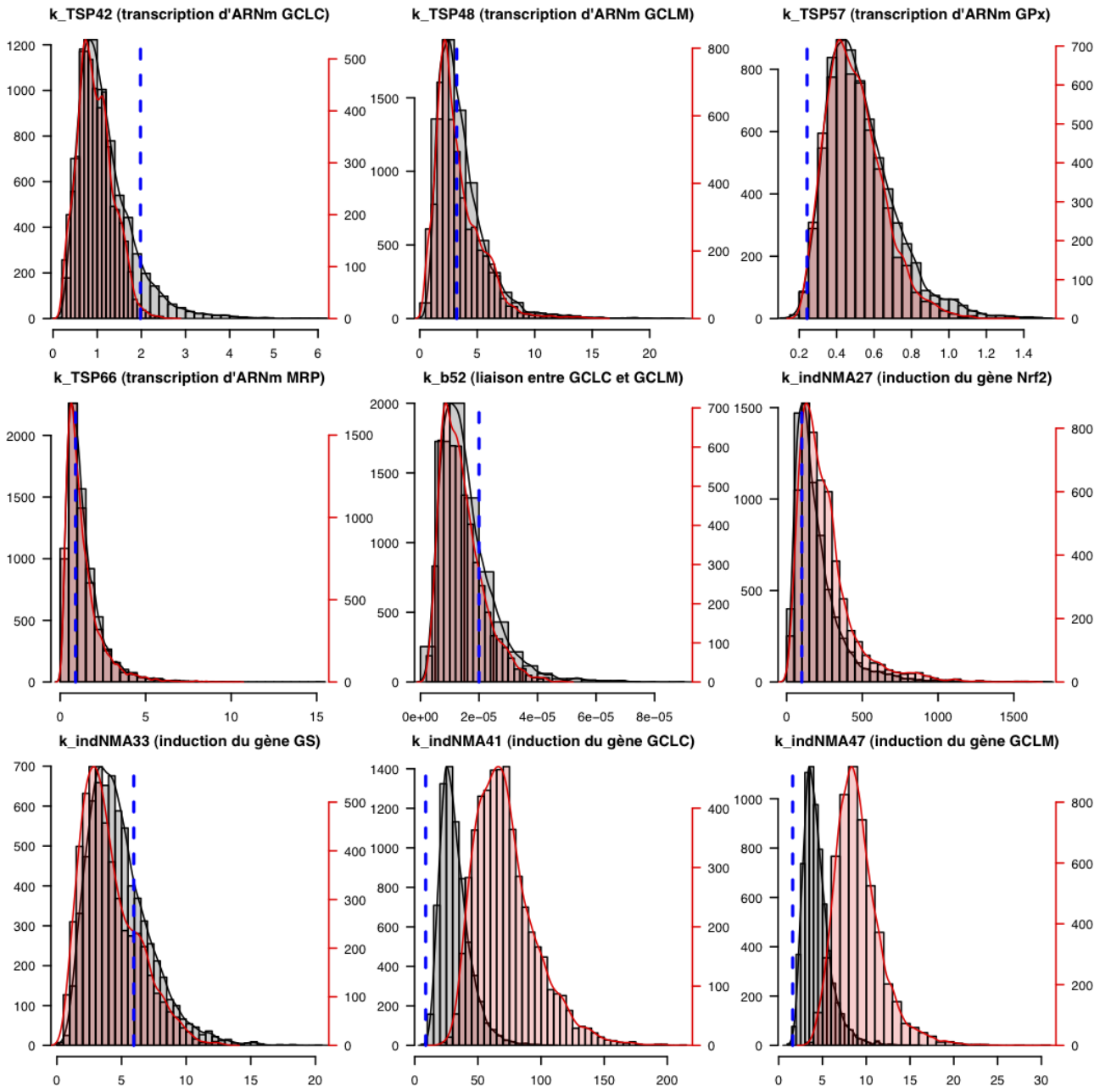


Figure 16b : Distributions des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions (en noir) et pour le second ensemble de solutions (en rouge). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution *a priori*.

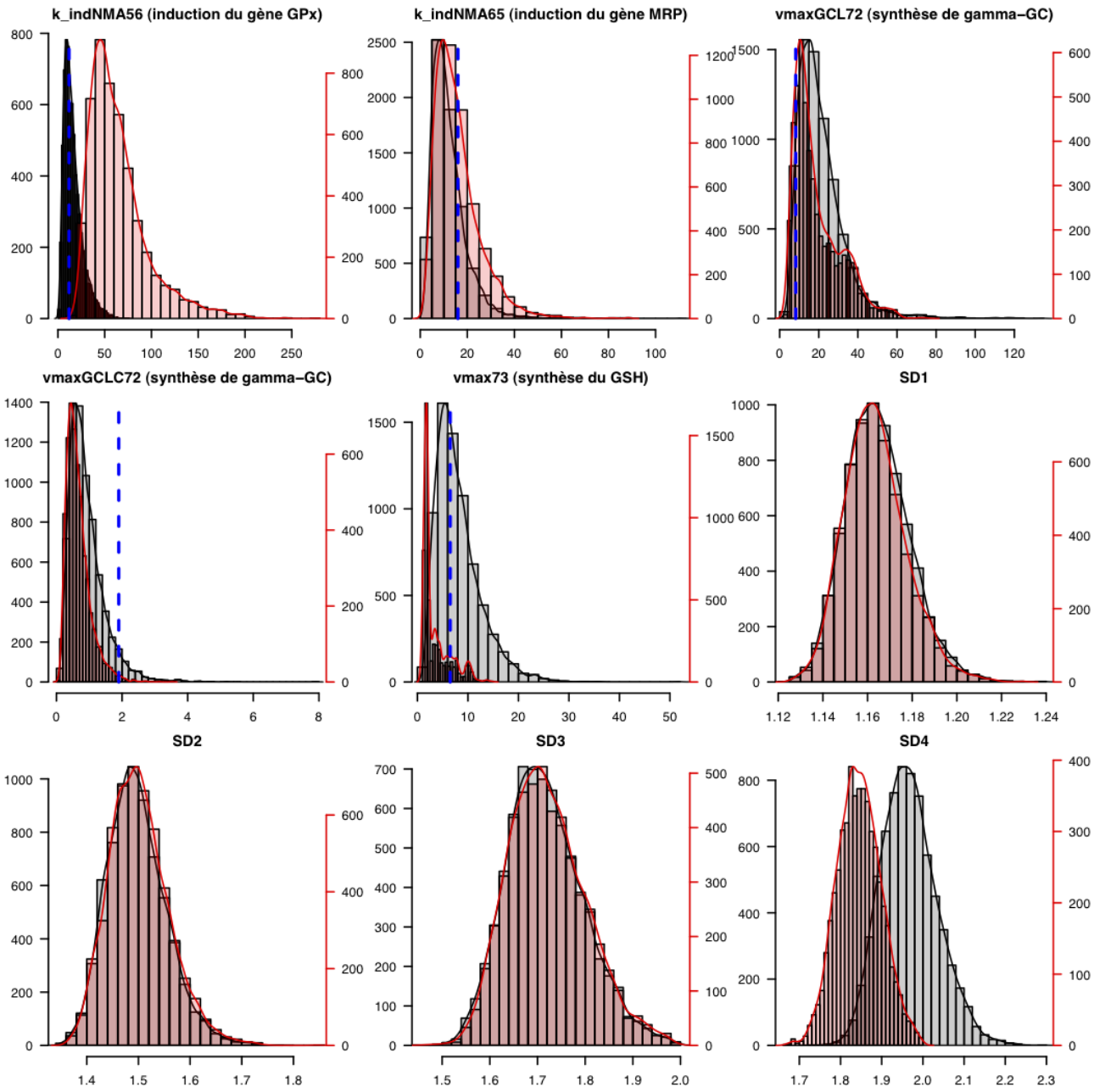


Figure 16c : Distributions des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions (en noir) et pour le second ensemble de solutions (en rouge). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution *a priori*.

Pour les deux ensembles de solutions, les distributions *a posteriori* des paramètres sont en général similaires. Seuls sept paramètres possèdent des distributions *a posteriori* clairement différentes selon l'ensemble de solutions choisi. Ces différences peuvent être séparées en deux catégories : celles où, selon l'ensemble de solutions, les distributions *a posteriori* sont « décalées » (centrées sur des valeurs différentes) mais possèdent une dispersion équivalente, et celles où c'est principalement la dispersion qui est modifiée. La première catégorie concerne certains paramètres impliqués, directement ou indirectement, dans la synthèse du GSH (le paramètre intervenant dans la transcription de l'ARNm de la GS et ceux intervenant dans l'induction des gènes GCLC, GCLM et GPx). Dans la seconde catégorie, on retrouve le vmax de l'équation modélisant la synthèse de GSH et deux paramètres impliqués dans la synthèse et l'action des ROS. Pour le SES, la dispersion de la distribution *a posteriori* de ces paramètres est beaucoup plus réduite pour le PES. Les deux paramètres impliqués dans la synthèse et l'action des ROS sont les seuls ayant une distribution *a priori* non-informative. Malgré un espace très large à leur disposition, les deux ensembles de solution convergent vers des solutions assez proches.

Enfin, comme expliqué précédemment, la distribution *a posteriori* de l'erreur sur les mesures concernant les données omiques (SD4) du SES est centrée sur une valeur plus faible que celle du PES.

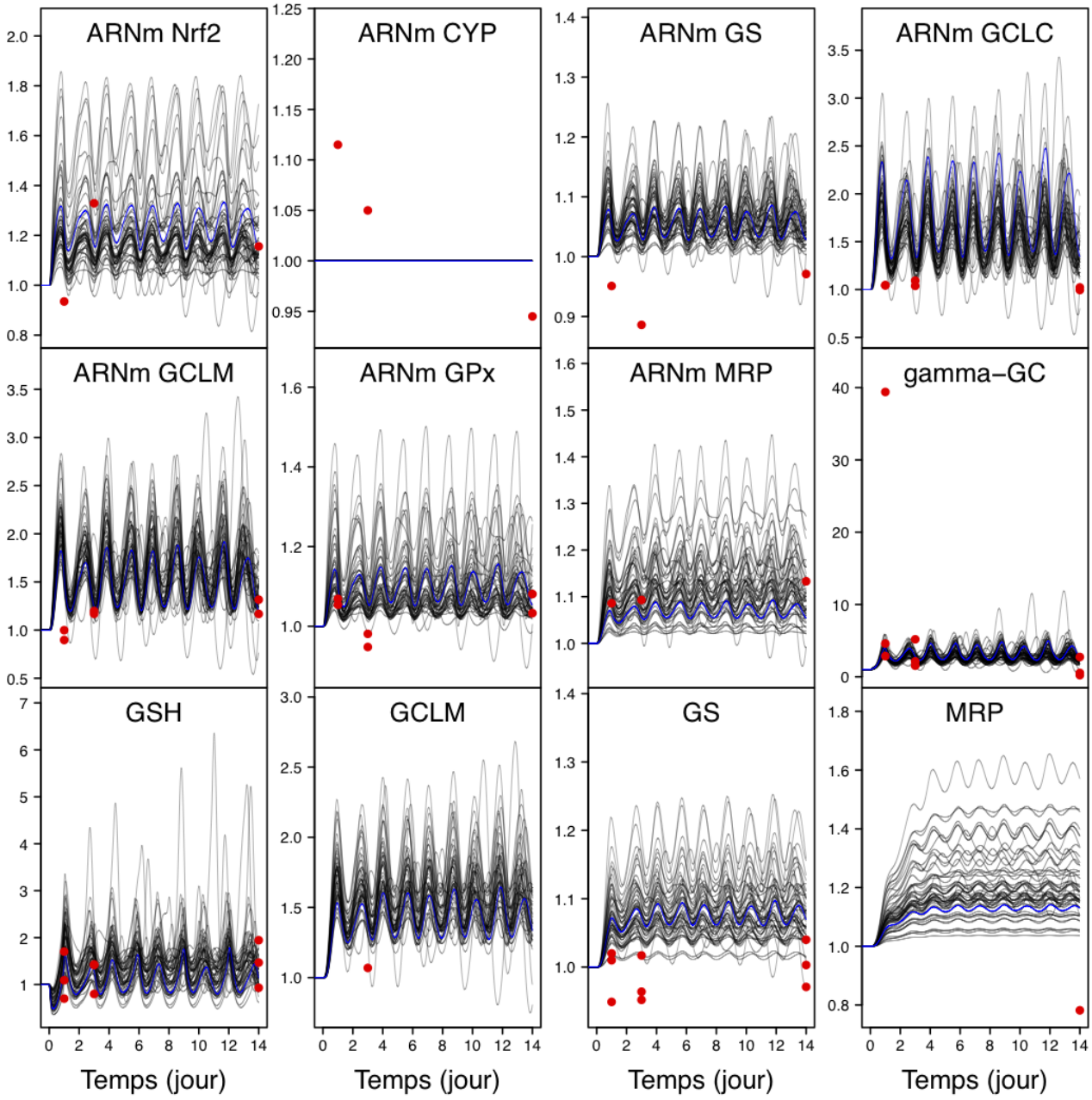


Figure 17 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*. Les cercles rouges représentent les données.

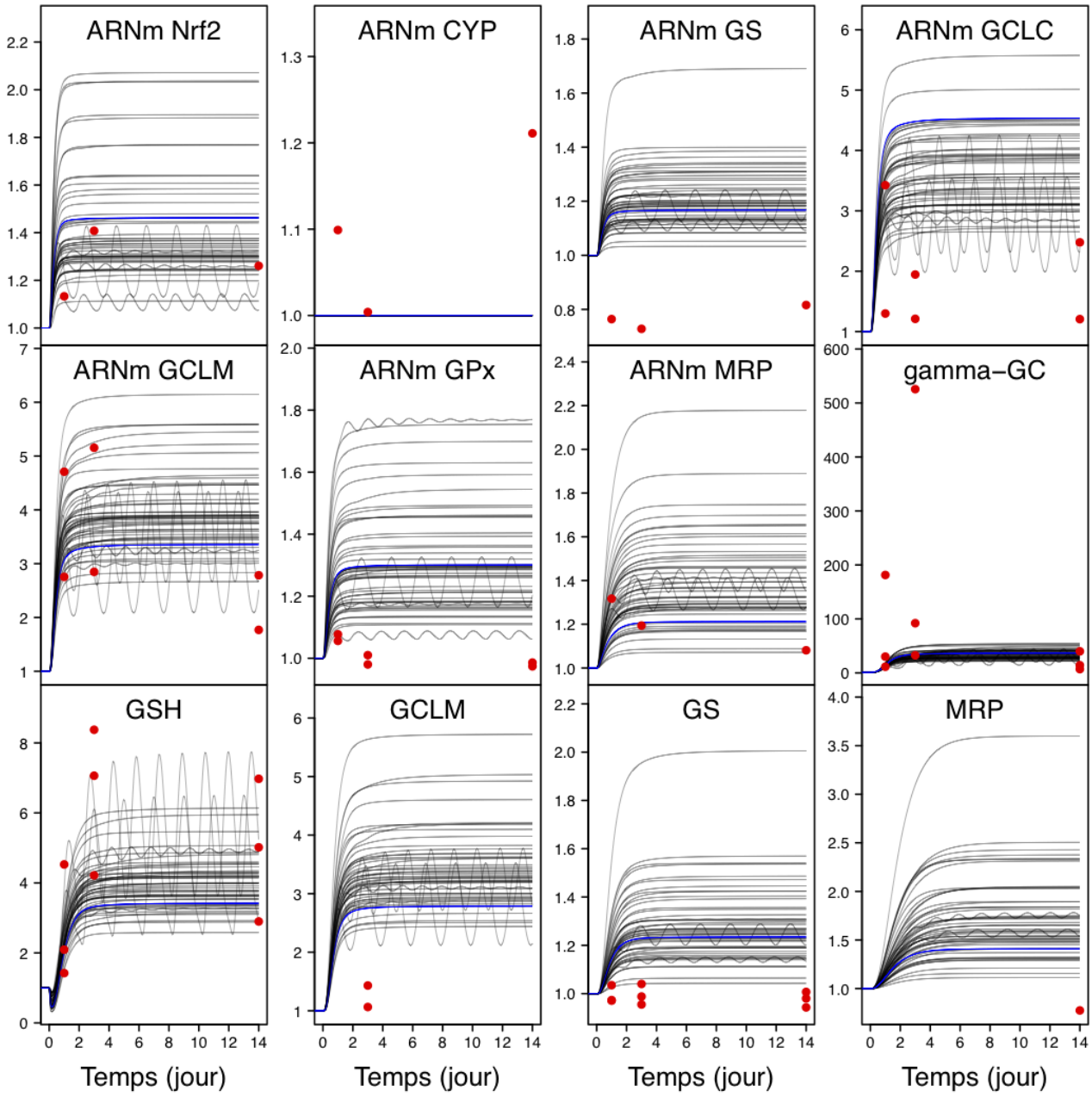


Figure 18 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*. Les cercles rouges représentent les données.

Les Figures 17 et 18 représentent, respectivement à faible concentration et forte concentration, les simulations obtenues avec le PES pour toutes les données omiques utilisées pour la calibration du modèle. Quelle que soit la durée d'observation et la concentration, toutes les variations des espèces observées (mise à part pour l'ARNm du CYP) suivent la même tendance. Par exemple, pour les courbes issues d'un même vecteur de paramètre, les oscillations ont exactement la même période d'une espèce à l'autre, par contre les amplitudes pourront être et seront souvent différentes. Ainsi, toutes les observations qui vont suivre sont valables pour toutes les espèces étudiées (mise à part pour l'ARNm du CYP).

A faible concentration (Figure 17), il est difficile de dire si le système est à l'équilibre après 14 jours. En effet, pour plusieurs courbes, les oscillations ne sont pas régulières et ne semblent pas se stabiliser (dont celle formée par le vecteur des paramètres le plus probable). Leurs amplitudes ne sont pas constantes et sont très différentes d'une courbe à l'autre. Pour leurs périodes, elles sont difficiles à déterminer et là aussi, très différentes d'une courbe à l'autre. Bien qu'elles soient différentes d'une courbe à l'autre, il est intéressant de remarquer qu'elles ne sont cependant jamais égales à 1 jour. C'est un élément remarquable car la période d'administration de la CsA est précisément égale à 1 jour alors qu'ici, la période de chaque oscillation est approximativement comprise entre 1,5 jours et 2 jours.

Pour la forte concentration (Figure 18), trois types de profils se dégagent :

- le premier type de profil est, comme pour la faible concentration, de type oscillant. Cependant contrairement à la faible concentration, les oscillations sont toutes régulières et la période des oscillations est la même pour les courbes présentant ce type de profil. La période est d'exactement 2 jours. Comme pour la faible concentration, les amplitudes des oscillations sont très différentes d'une courbe à l'autre. Ce profil ne concerne que quelques courbes.
- le deuxième type de profil possède une phase croissante et se termine en plateau. Les plateaux se stabilisent à des valeurs maximales différentes d'une courbe à l'autre. Ce profil concerne la majorité des courbes.
- le troisième type de profil est un mélange des deux précédents. En effet, il est possible d'observer la présence de faibles oscillations en début de courbe, puis une diminution progressive de l'amplitude de ces oscillations, pour terminer sur une disparation complète d'oscillations. Ce profil ne concerne que quelques courbes et pour certaines de ces courbes, les oscillations n'ont toujours pas complètement disparues au bout des 14 jours.

Enfin, l'équilibre semble déjà atteint au bout de 14 jours pour la plupart des courbes.

Que ce soit à faible concentration ou forte concentration les données sont globalement bien prédites.

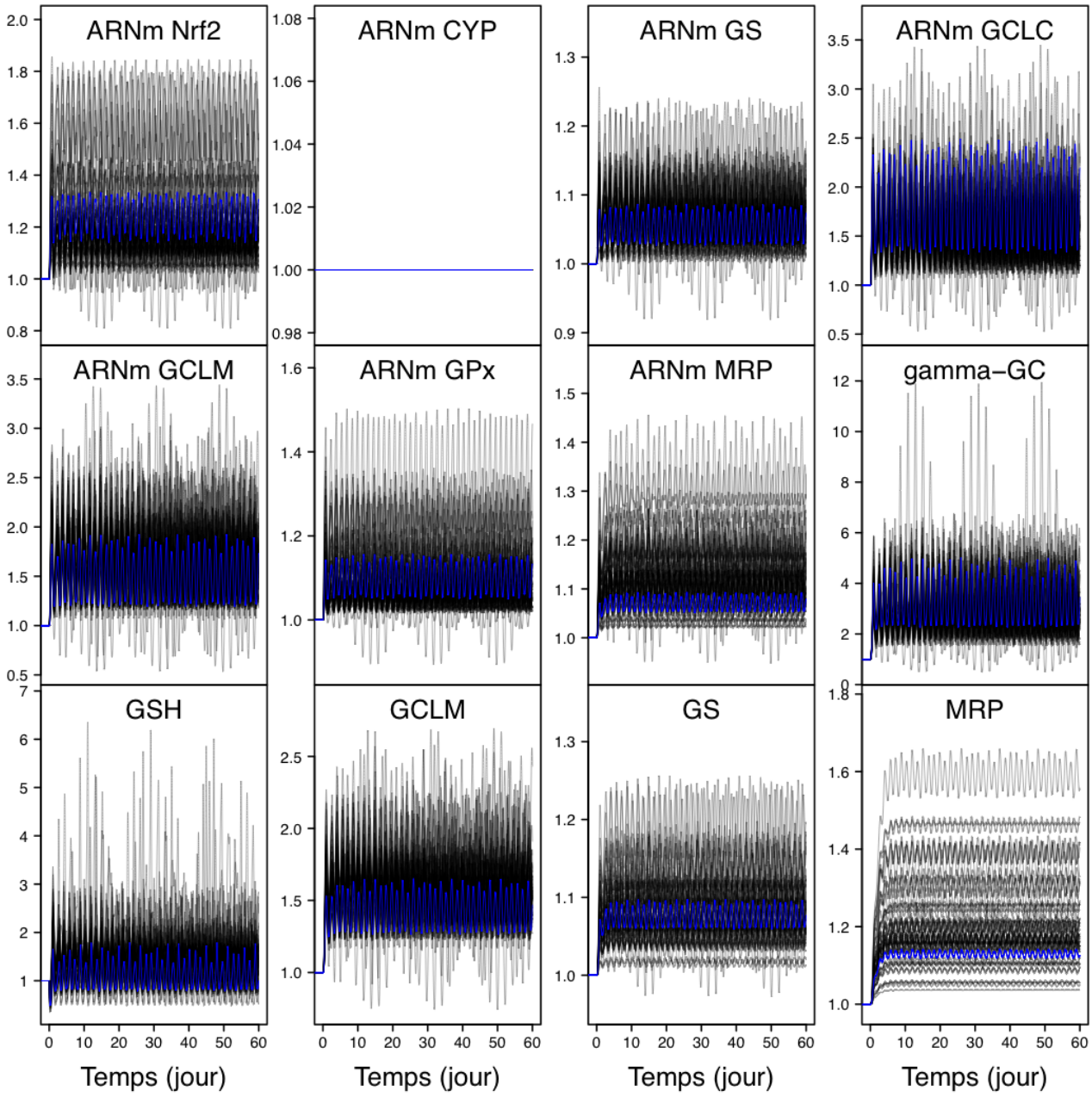


Figure 19 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

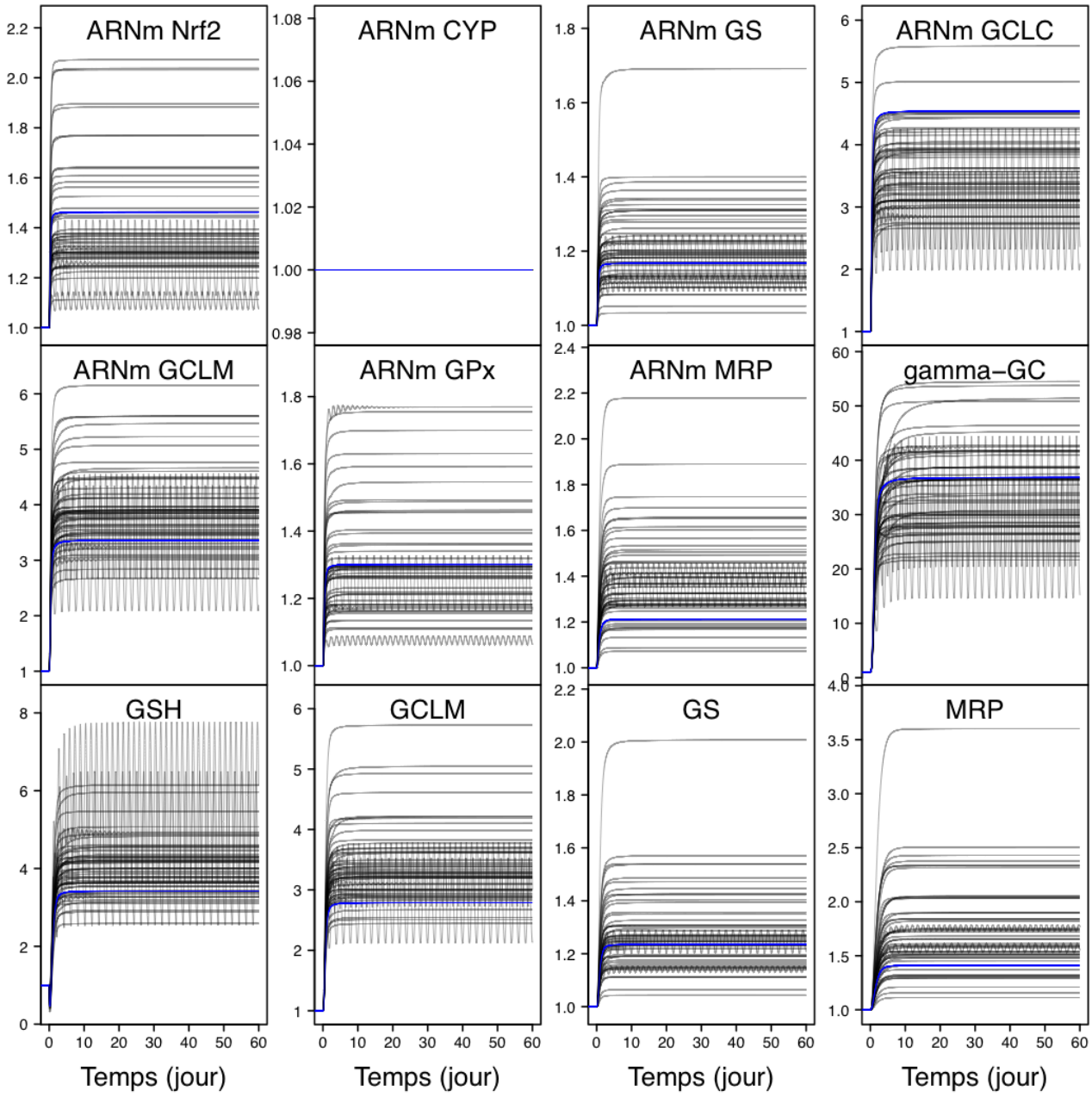


Figure 20 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM . Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori.*

Les Figures 19 et 20, qui représentent le même type de données mais dont l'observation est étendue à 60 jours, nous permettent de compléter la description des phénomènes précédents. En effet, pour la forte concentration (Figure 20), on retrouve sur 60 jours les trois même types de profils que rencontrés sur 14 jours. Il est donc possible de confirmer que, pour la majorité des solutions, l'équilibre est atteint au bout de 14 jours. Pour la faible concentration (Figure 19), la présence d'une période très longue pour un motif complet, difficile à observer sur 14 jours, est mise en évidence sur 60 jours. S'il est difficile de déterminer la période des oscillations sur 14 jours, c'est parce qu'il semblerait que cette période comporte en réalité plusieurs oscillations. Selon les solutions utilisées, les périodes de ces longs motifs semblent comprises entre 15 et 20 jours.

Afin de comprendre les différences observées à forte concentration entre les différentes solutions du PES, des simulations sans administration de CsA ont été réalisées, et sont regroupées dans les Figures 21 à 23.

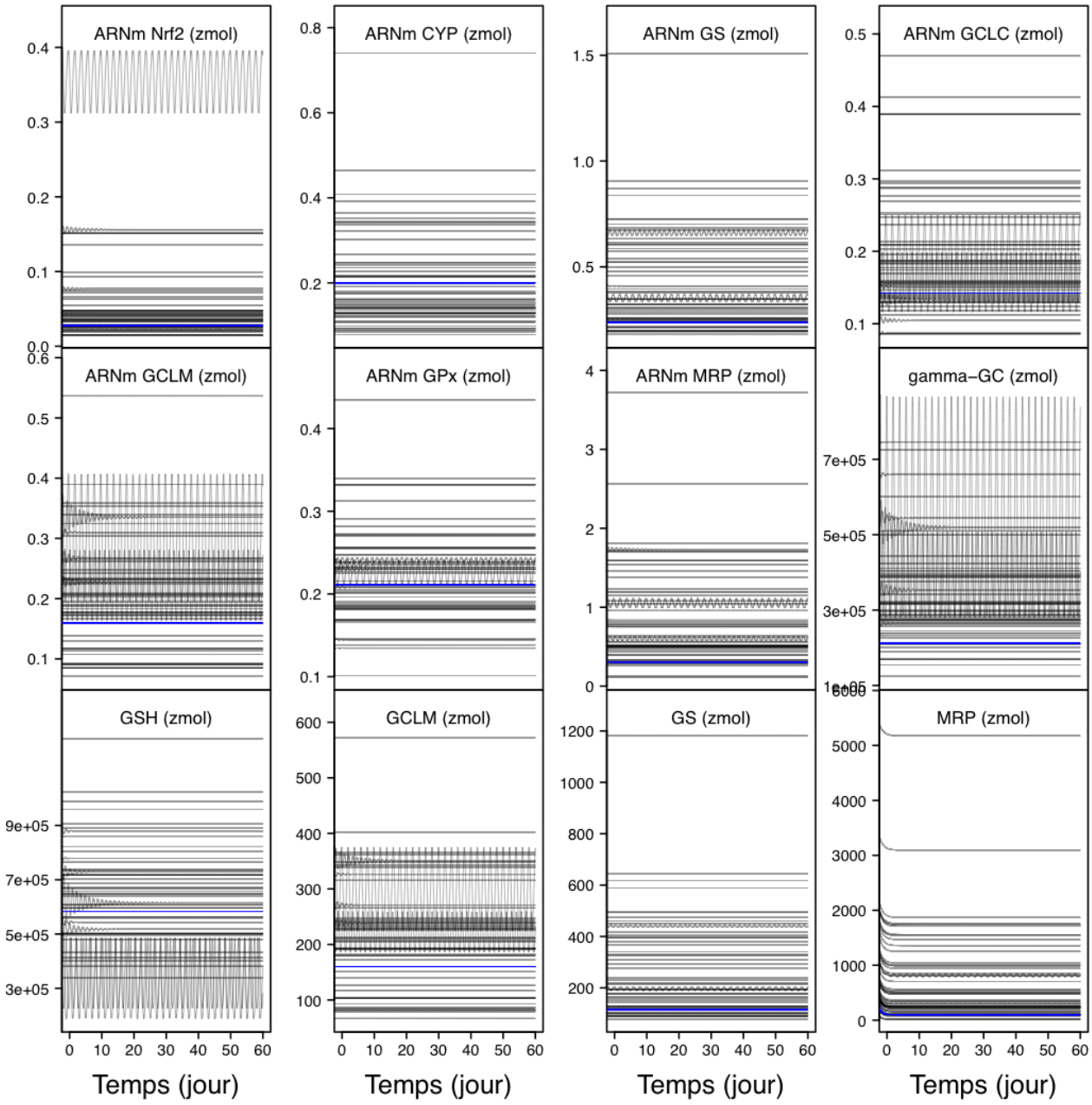


Figure 21 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et sans administration de CsA. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

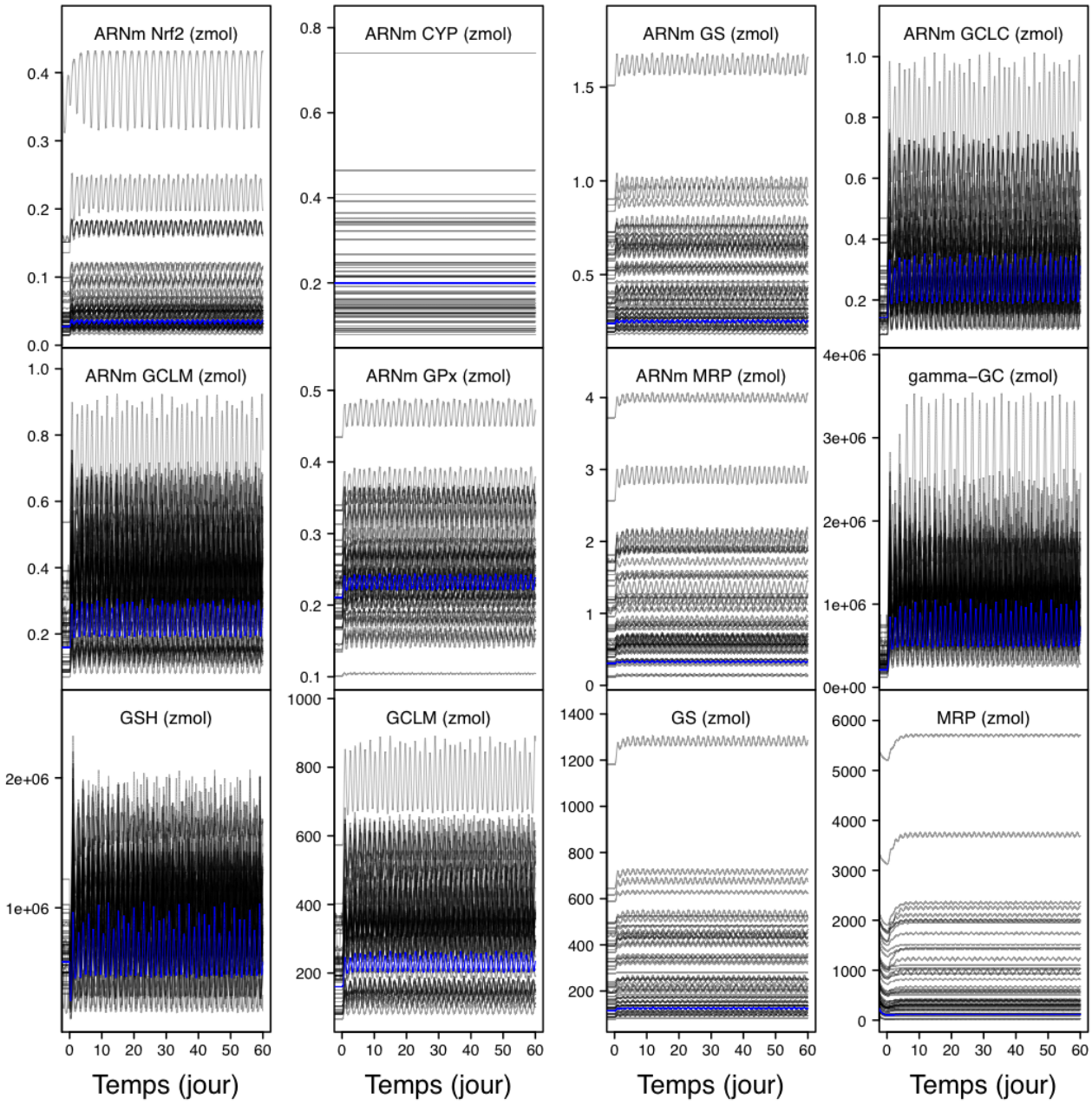


Figure 22 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

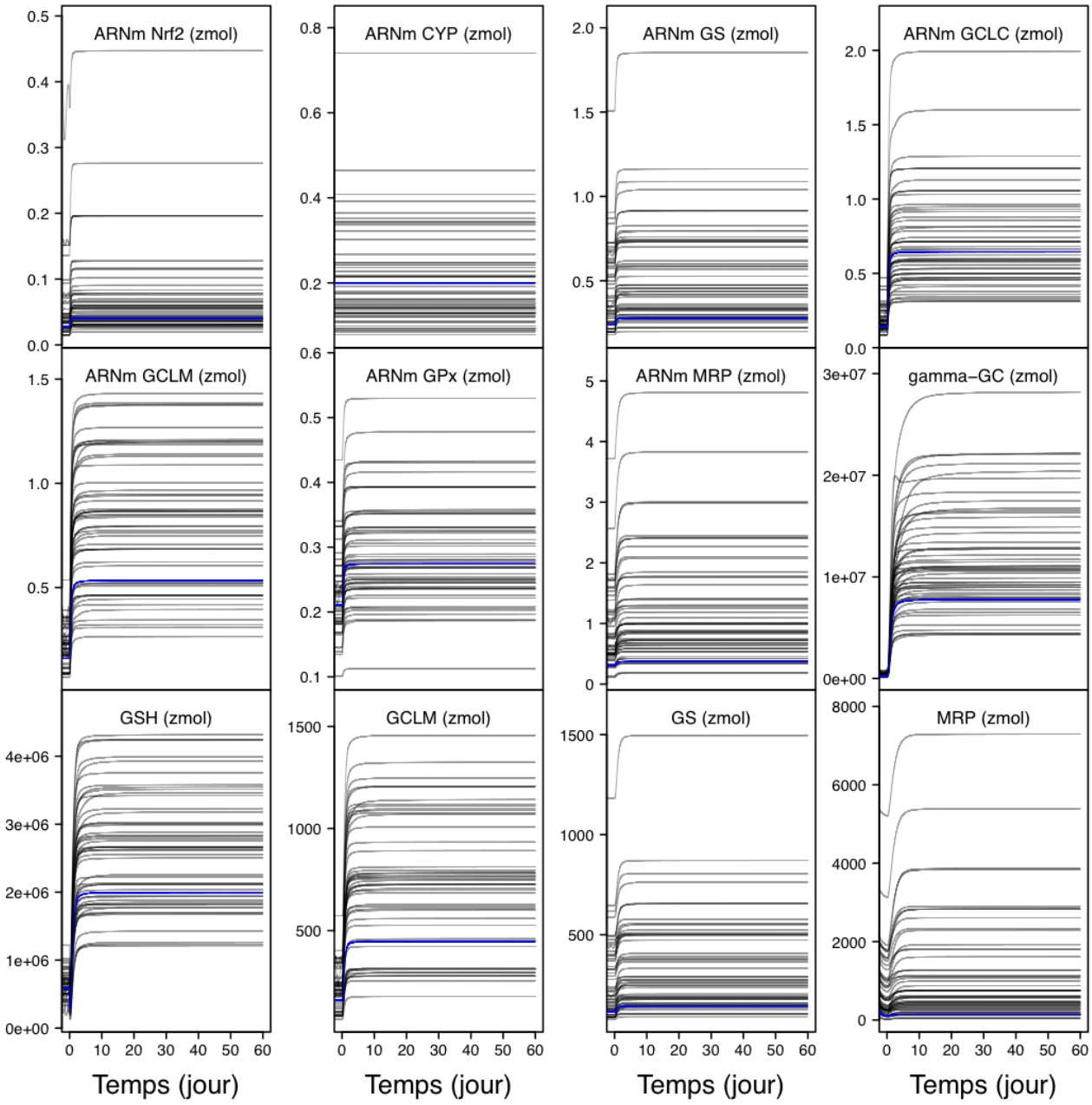


Figure 23 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

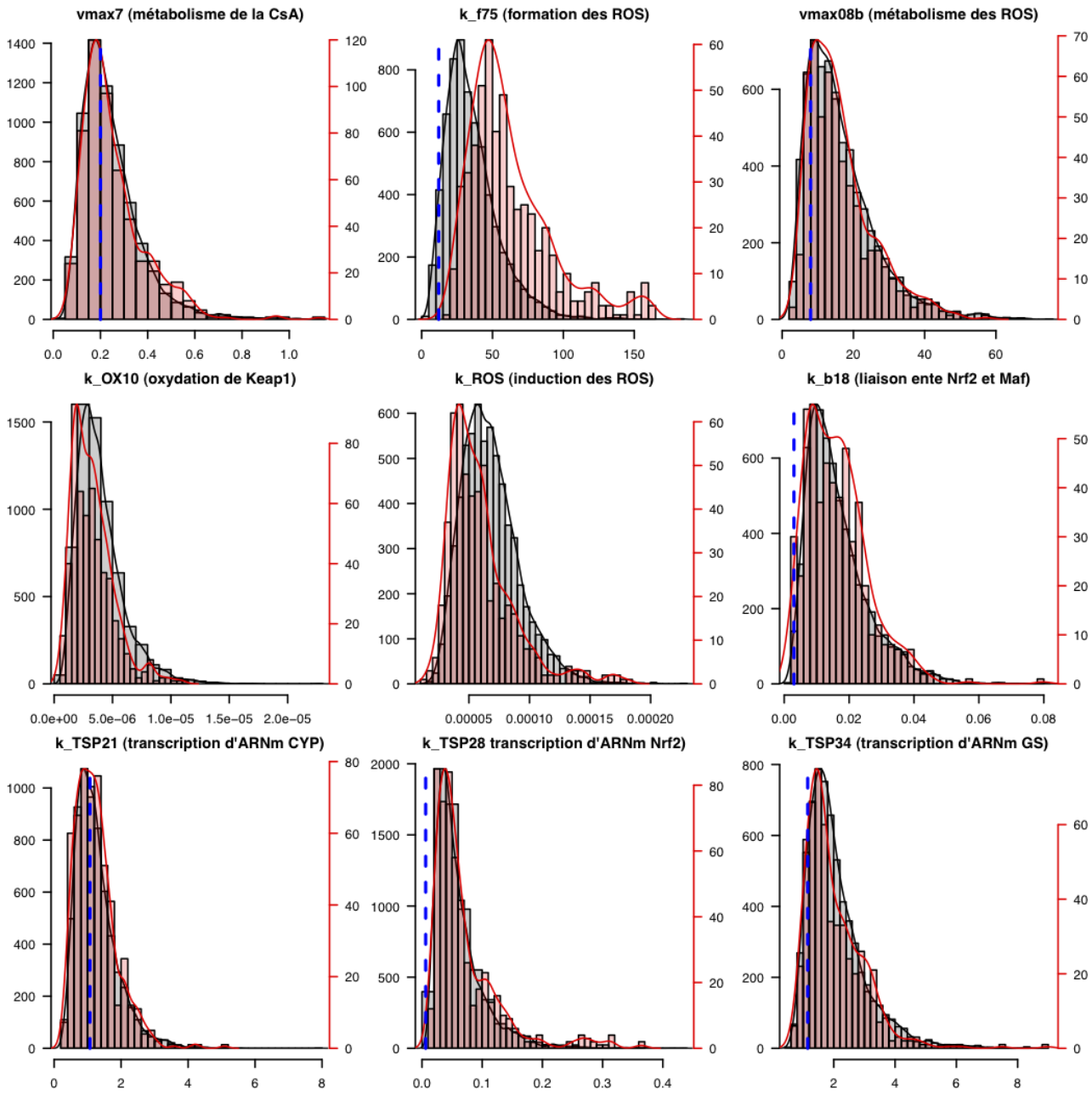


Figure 24a : Distributions *a posteriori* des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution *a priori*.

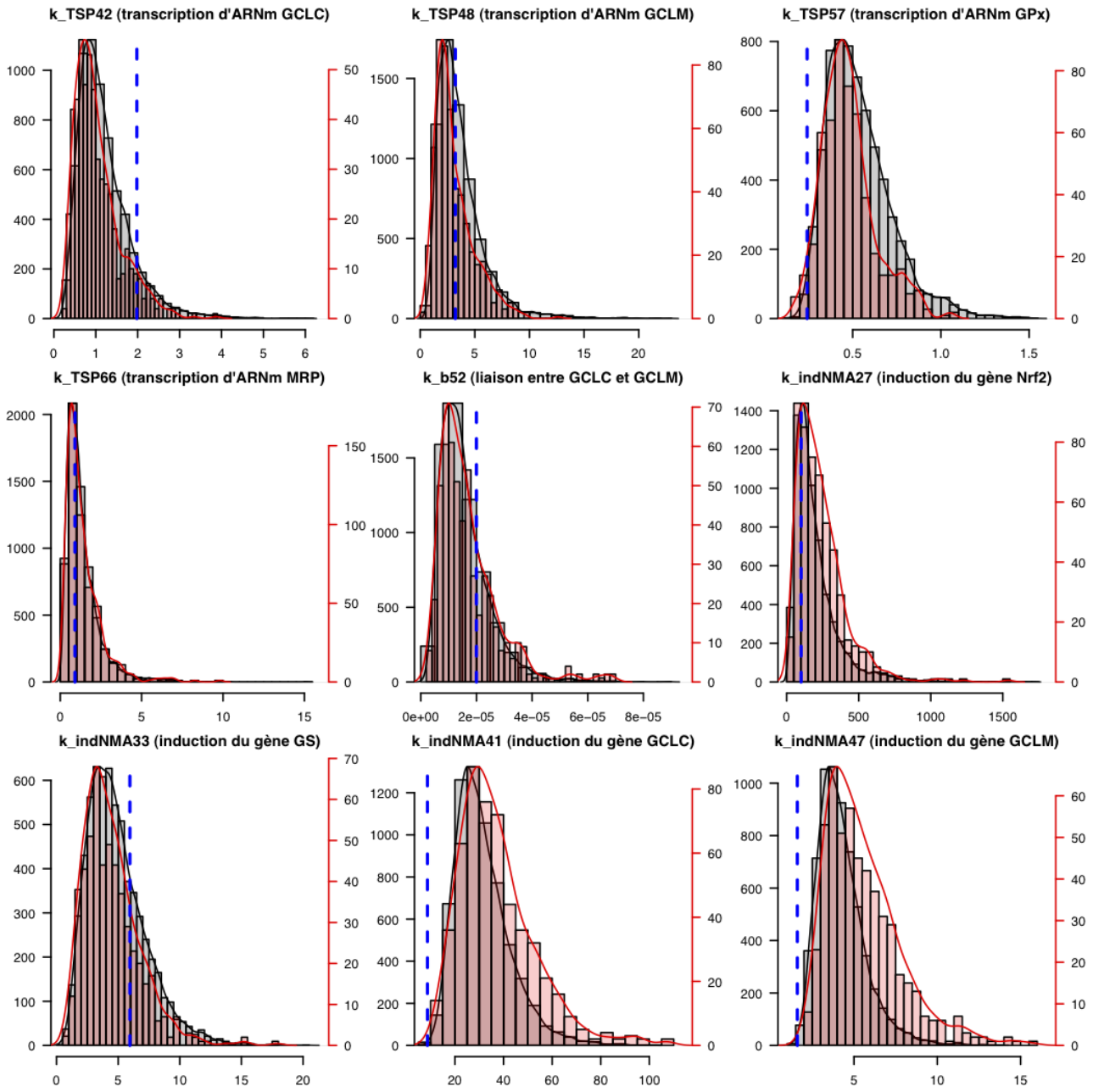


Figure 24b : Distributions *a posteriori* des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution *a priori*.

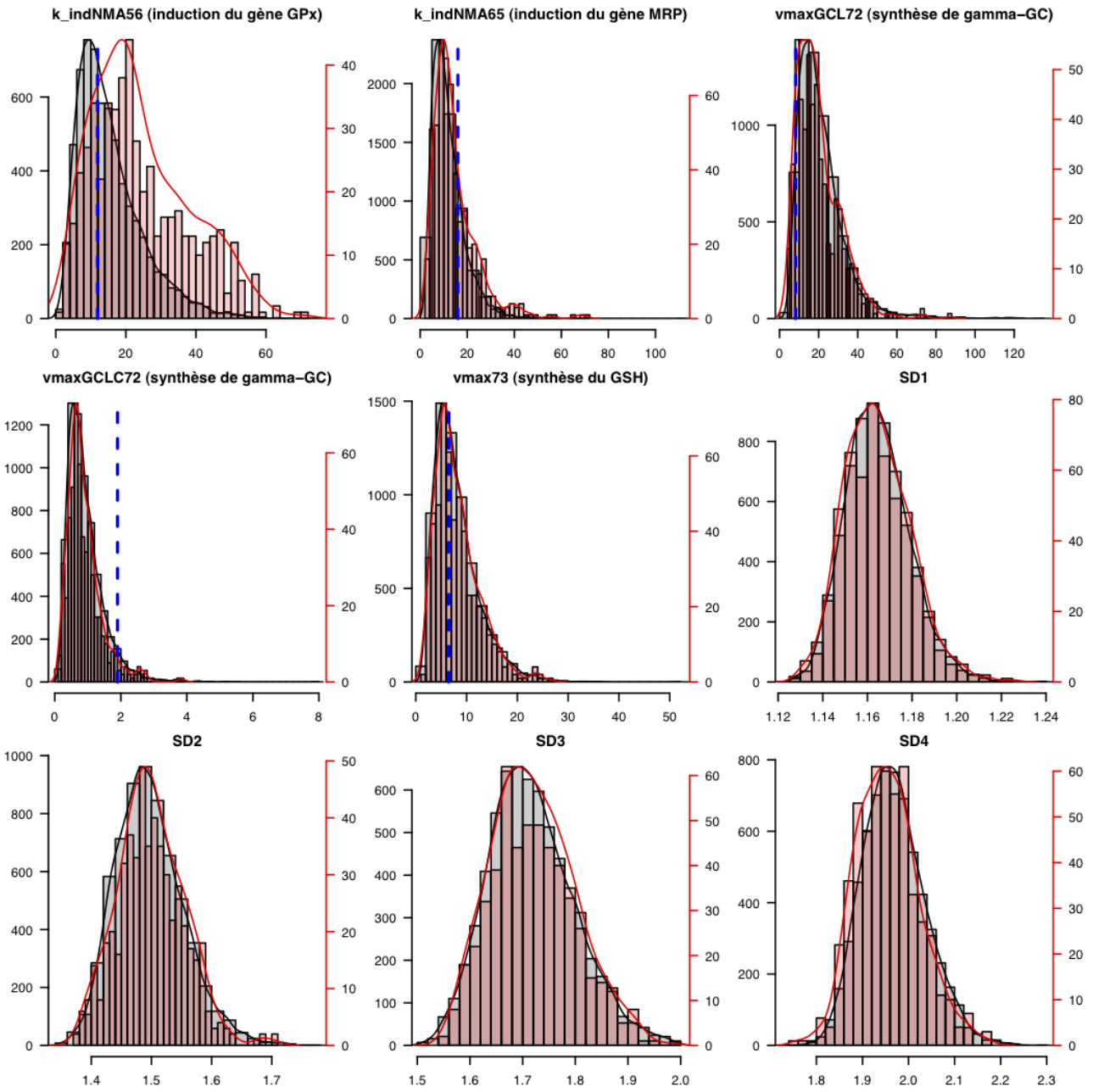


Figure 24c : Distributions *a posteriori* des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le premier ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution *a priori*.

Contrairement aux Figures 17 à 20, dans les Figures 21 à 23 les résultats ne sont pas présentés sous forme de FC. Ainsi, la présence d'oscillations visibles pour certaines solutions dans les Figures 18 et 20 peut être expliquée par des oscillations à dose zéro. Cette hypothèse est confirmée par les résultats présentés dans la Figure 23, puisqu'on remarque ici l'absence totale d'oscillations. Afin de repérer le ou les paramètre(s) responsable(s) de ces oscillations à dose zéro, et afin de vérifier si ce sous-ensemble de solutions présente un intérêt plus grand, une nouvelle étude de la distribution *a posteriori* des paramètres a été réalisée. Dans cette étude, dont les résultats sont regroupés dans la Figure 24, les paramètres des solutions présentant des oscillations à dose zéro ont été séparés des paramètres des autres solutions.

Parmi toutes les distributions *a posteriori* des paramètres conduisant (en rouge) ou non (en noir) à des oscillations à dose zéro, seules deux d'entre elles se distinguent des autres. Ces deux distributions concernent les paramètres de formation et d'induction des ROS. Concernant les paramètres statistiques, aucune différence notable n'est à signaler dans leur distribution. Ainsi, à la simple vue de ces résultats, il n'est pas possible de donner plus de valeur ou de crédibilité à l'un ou à l'autre de ces sous-ensembles du PES. De plus, au vu des résultats concernant les prédictions, il semblerait que la présence de ces oscillations à dose zéro n'ait aucune conséquence majeure sur le système.

Les Figures 25 à 28 illustrent l'évolution des quantités intracellulaires de ROS et intranucléaires de Nrf2 à faible et forte concentration, pour le PES.

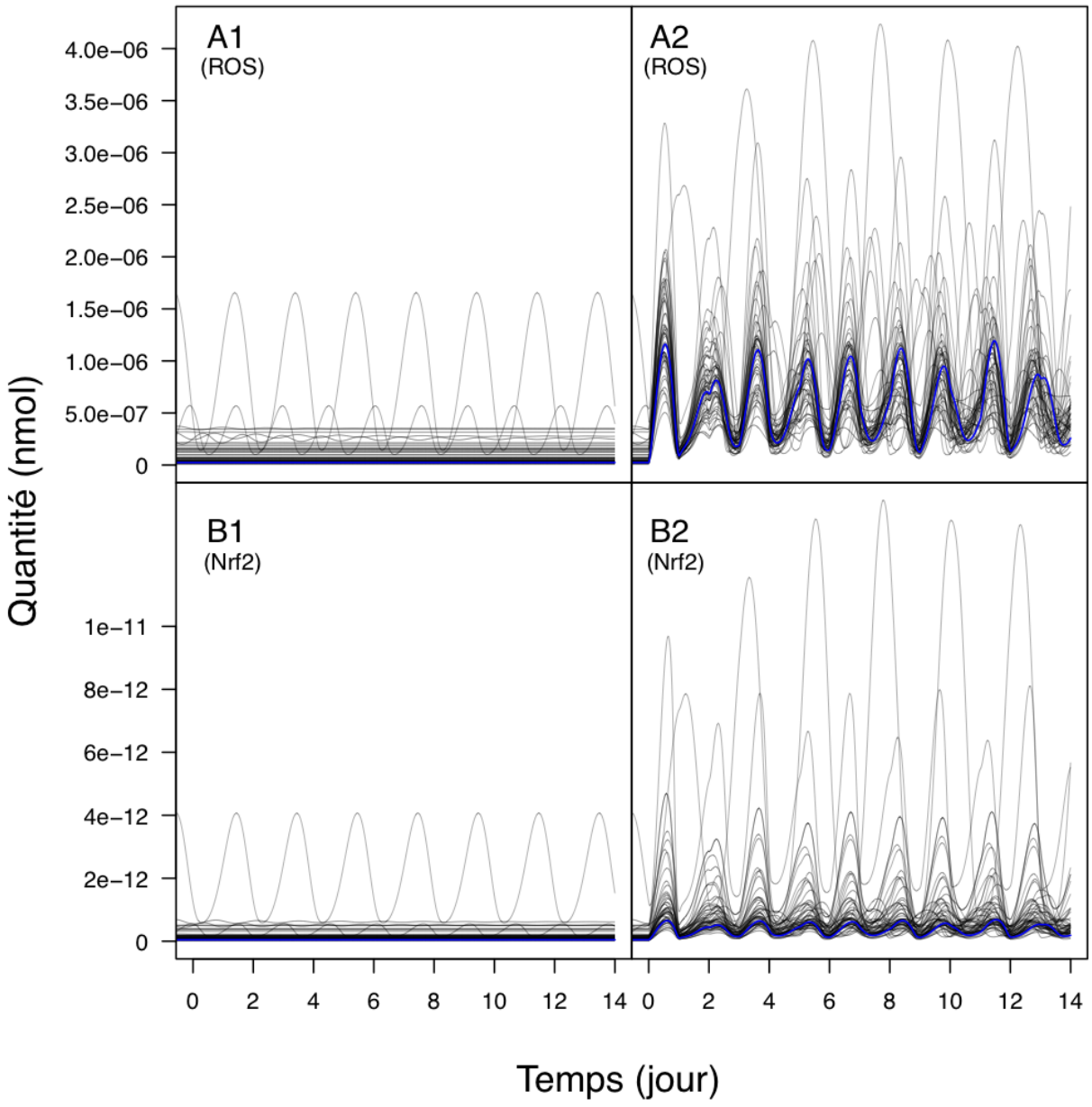


Figure 25 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 14 jours), pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A2 et B2), et sans administration de CsA (A1 et B1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori.*

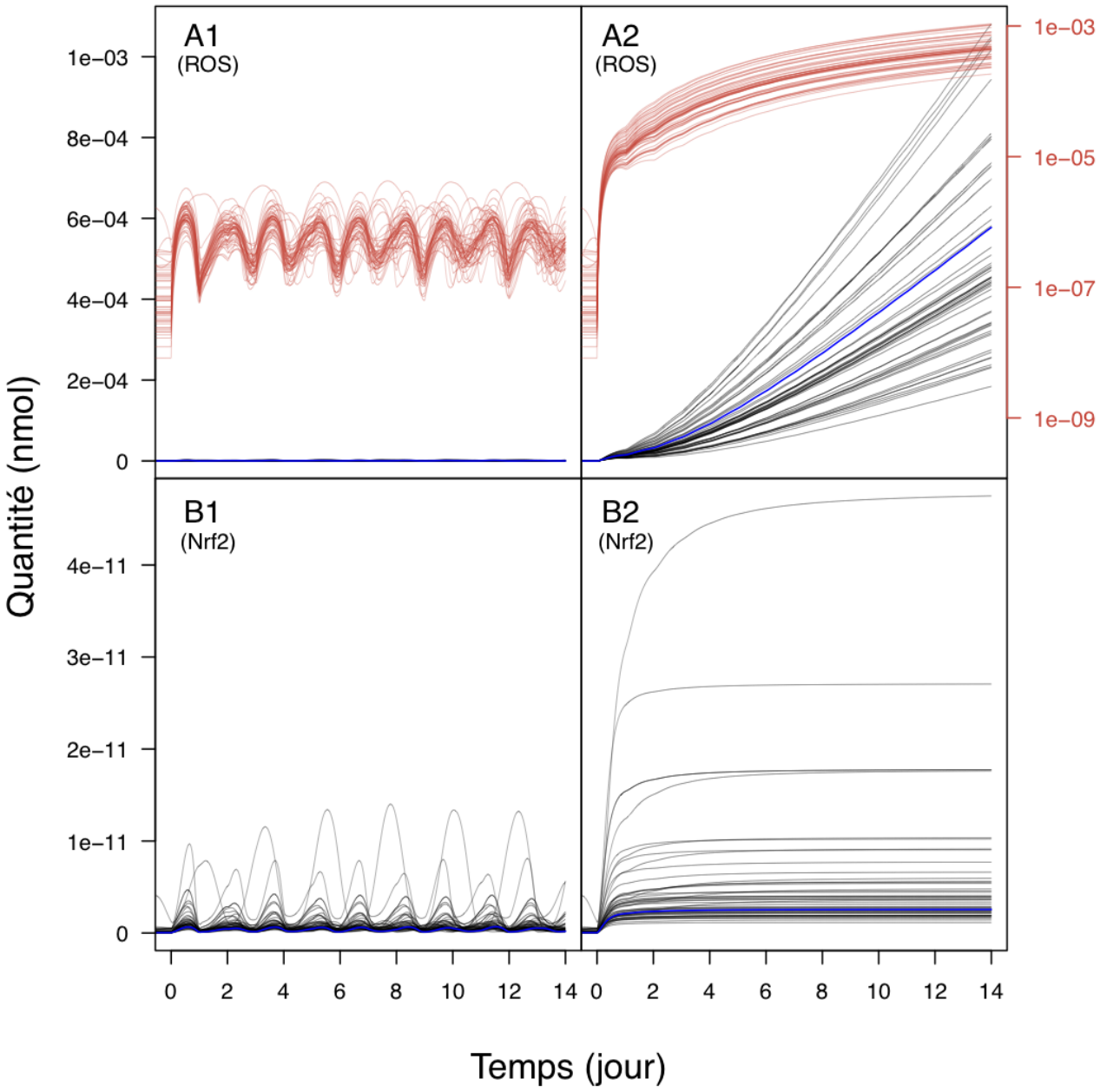


Figure 26 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 14 jours), pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A1 et B1), et à 15 µM (A2 et B2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*. Les courbes rouges représentent les mêmes prédictions que les courbes noires et bleue, mais avec une échelle logarithmique pour l'axe des ordonnées.

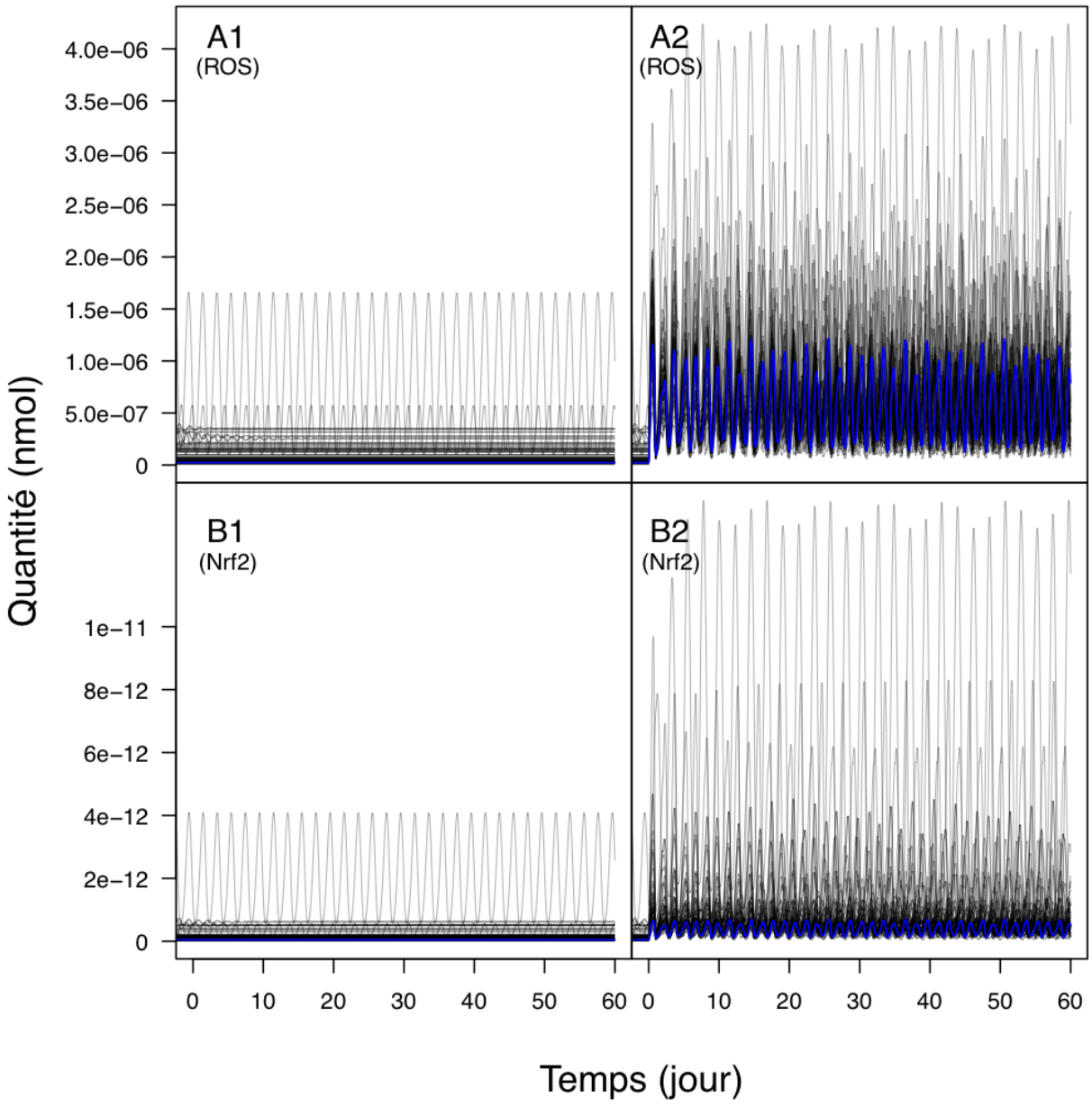


Figure 27 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 60 jours), pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A2 et B2), et sans administration de CsA (A1 et B1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

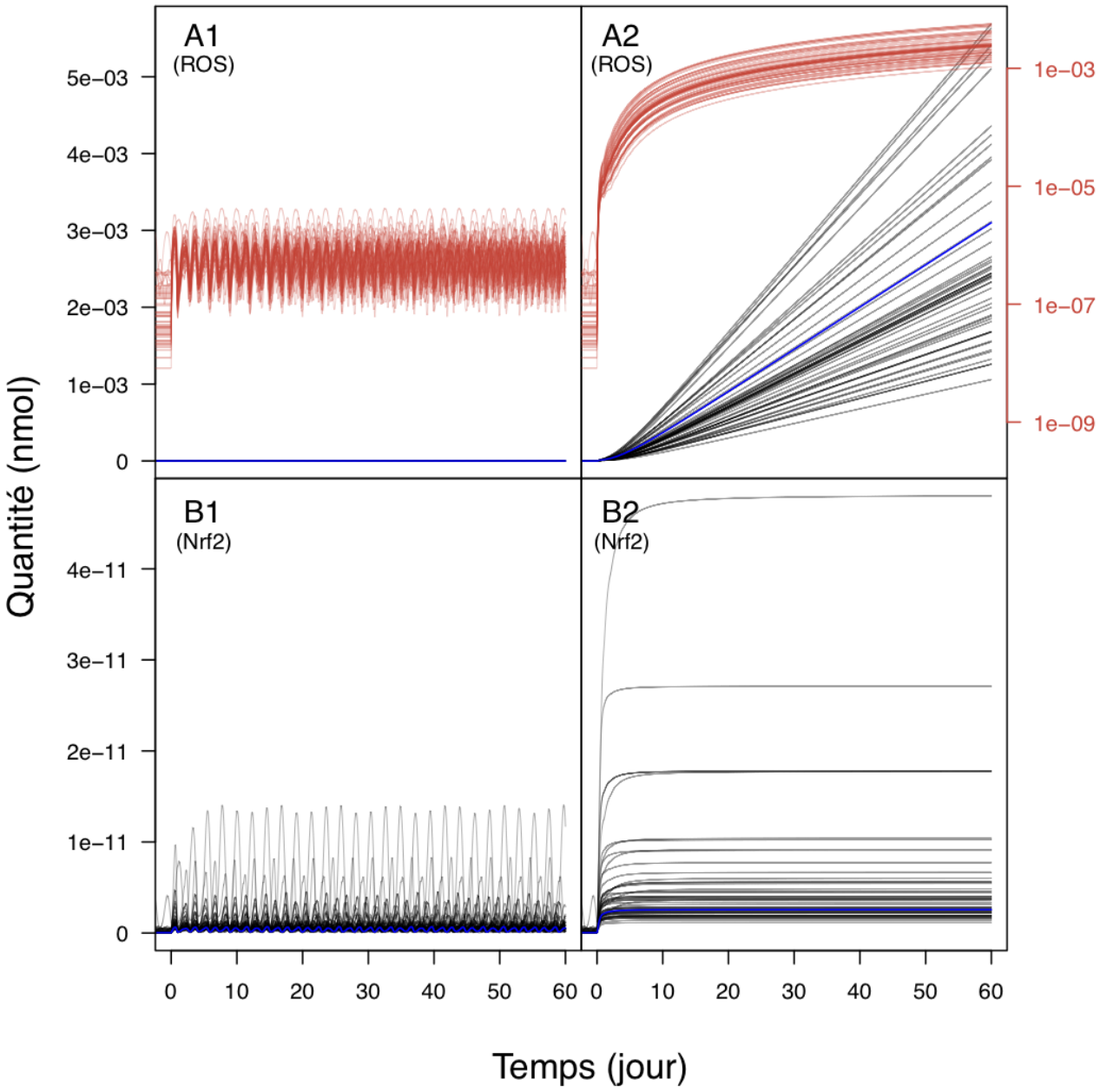


Figure 28 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 60 jours), pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A1 et B1), et à 15 µM (A2 et B2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le premier ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du premier ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*. Les courbes rouges représentent les mêmes prédictions que les courbes noires et bleue, mais avec une échelle logarithmique pour l'axe des ordonnées.

Une différence importante entre les prédictions réalisées à faible concentration et celles réalisées à forte concentration est clairement observable au niveau des quantités intracellulaires des ROS. En effet, alors qu'à faible concentration, les quantités de ROS semblent suivre le même type de profil oscillant que la plupart des autres espèces du modèle, à forte concentration, les profils des quantités de ROS ne ressemblent à aucun autre vu pour le moment. Alors que pour la plupart des espèces du modèle, leurs quantités se stabilisent rapidement à un plateau, les quantités des ROS ne cessent d'augmenter. Au vu des résultats obtenus sur 60 jours, qui sont très similaires à ceux obtenus sur 14 jours, il est très probable que la tendance reste la même quelle que soit la durée d'observation. Grâce à l'utilisation de l'échelle semi-logarithmique, il est possible d'affirmer que la croissance incessante des quantités intracellulaires des ROS n'est pas de type exponentiel, car elle ne se traduit pas par une droite sur l'échelle semi-logarithmique, mais serait plutôt linéaire ou de type puissance. Ce type de profil est probablement dû à la forme particulière de l'équation modélisant l'élimination des ROS. En effet, contrairement aux omiques présents dans le modèle et dont l'équation modélisant leur élimination est du premier ordre, l'équation modélisant l'élimination des ROS est de type Michaelis-Menten. Ce type d'équation permettant de modéliser les mécanismes saturables, il est fort probable que dans le cas présent, l'enzyme prenant en charge l'élimination des ROS soit saturée à forte concentration, causant ainsi l'accumulation des ROS dans la cellule. Pour les quantités intranucléaires de Nrf2, que ce soit à faible concentration ou à forte concentration, toutes les courbes présentent les même profils que ceux observés avec les autres espèces du modèle : elles sont de type oscillant à faible concentration, et atteignent rapidement un plateau pour la forte concentration. Là encore, les plateaux se stabilisent à des valeurs différentes selon les vecteurs de paramètres utilisés.

Les Figures 29 à 32 regroupent les résultats obtenus en modifiant la concentration en CsA administrée. Les simulations qui vont suivre ont été réalisées en utilisant un seul vecteur de paramètre (le plus probable). Cependant, d'autres simulations ont été réalisées en utilisant un vecteur de paramètre présentant des profils oscillants à dose zéro (sans administration de CsA). Comme expliqué précédemment, ces oscillations à dose zéro ne semblent avoir aucune influence sur le système. Cette hypothèse est maintenant confirmée car les prédictions obtenues en utilisant le vecteur de paramètre présentant des profils oscillants à dose zéro sont similaires à celles obtenues en utilisant un vecteur de paramètre (vecteur le plus probable) ne présentant pas d'oscillations à dose zéro. Ainsi, seuls les résultats obtenus en utilisant le vecteur le plus probable seront présentés. Enfin, tous les résultats obtenus pour les espèces du modèle ne sont pas présentés car pour la plupart de celles-ci, ils sont similaires. Seuls quatre espèces sont représentées car les résultats concernant la

GSH, la GPx, la GCL, la GS, la GCLM et la GCLC sont très proches, si ce n'est identique, en terme de profil de courbe (les valeurs, quant à elles, sont différentes d'une espèce à l'autre).

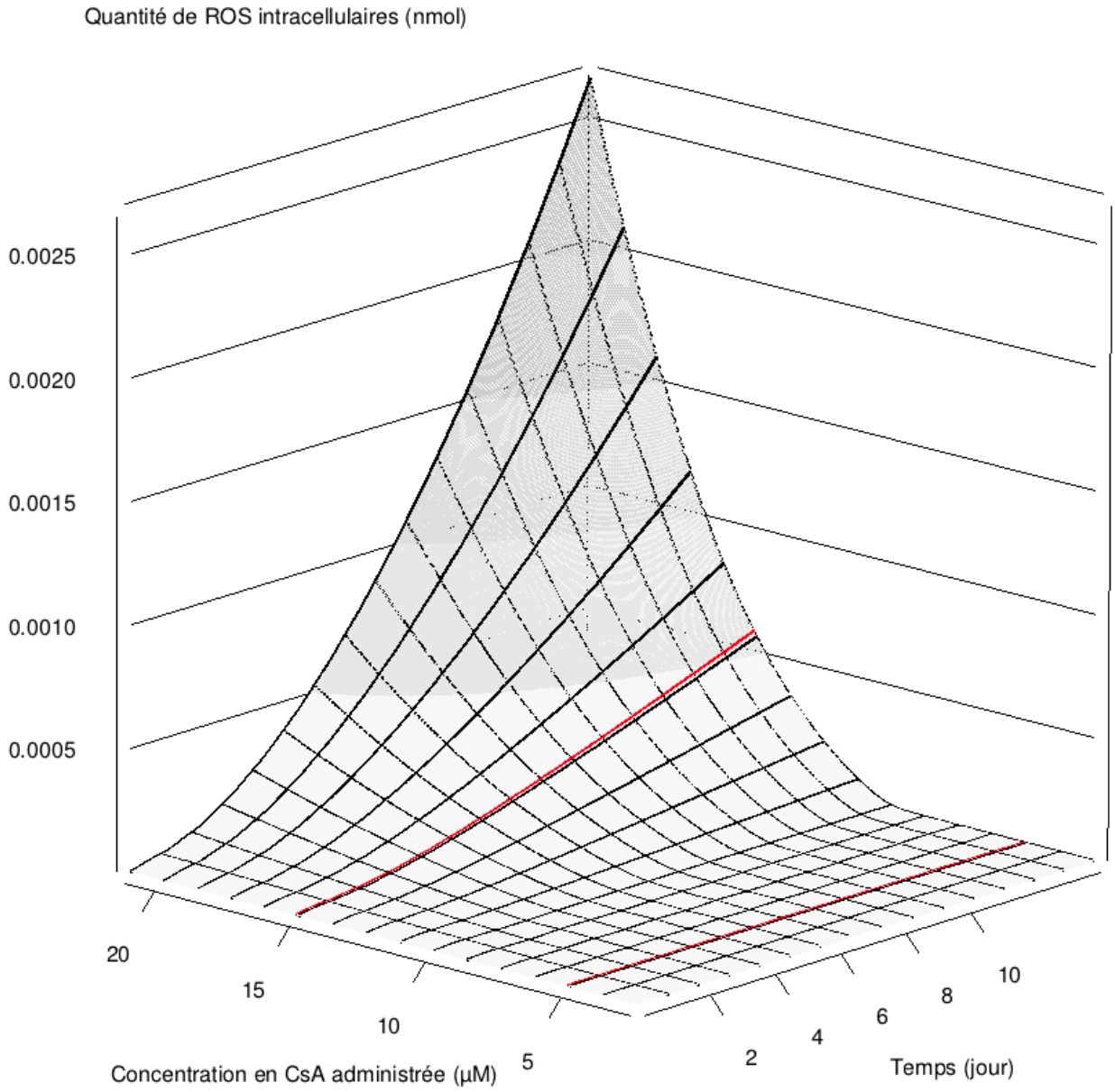


Figure 29 : Représentation graphique des quantités intracellulairse des ROS, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du PES et ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

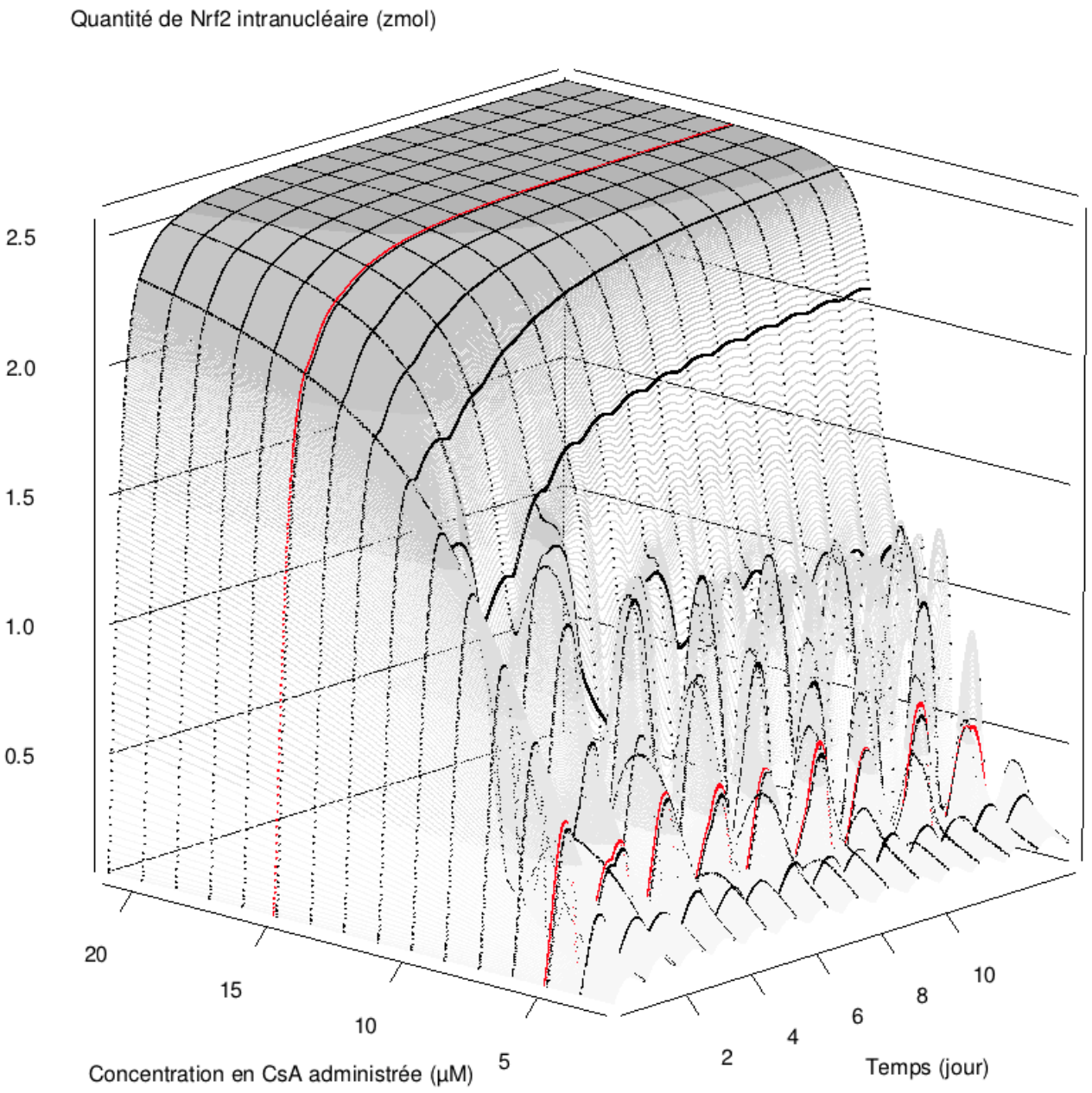


Figure 30 : Représentation graphique des quantités intranucléaires de Nrf2, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du PES et ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

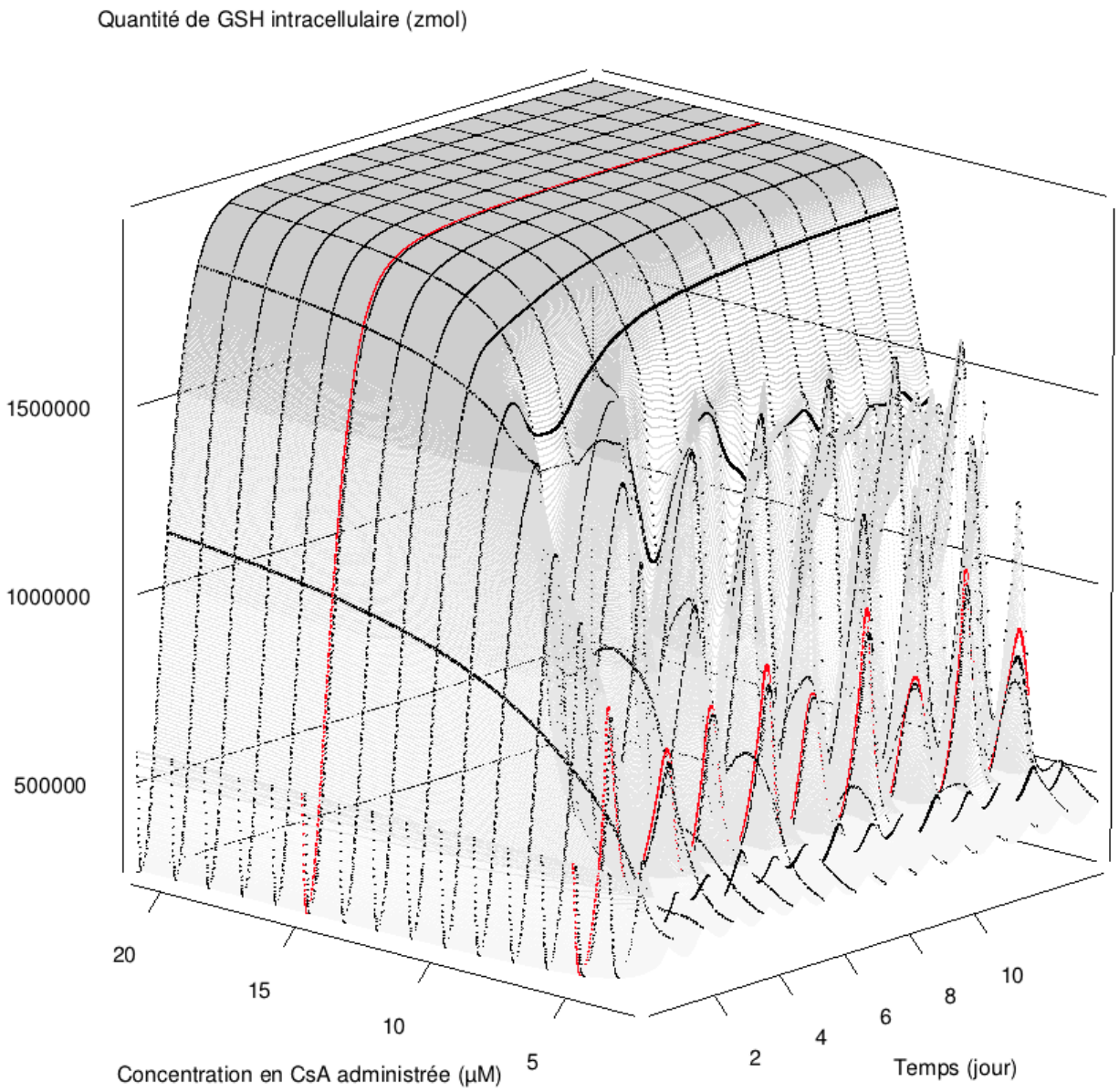


Figure 31 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de GSH, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du PES et ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

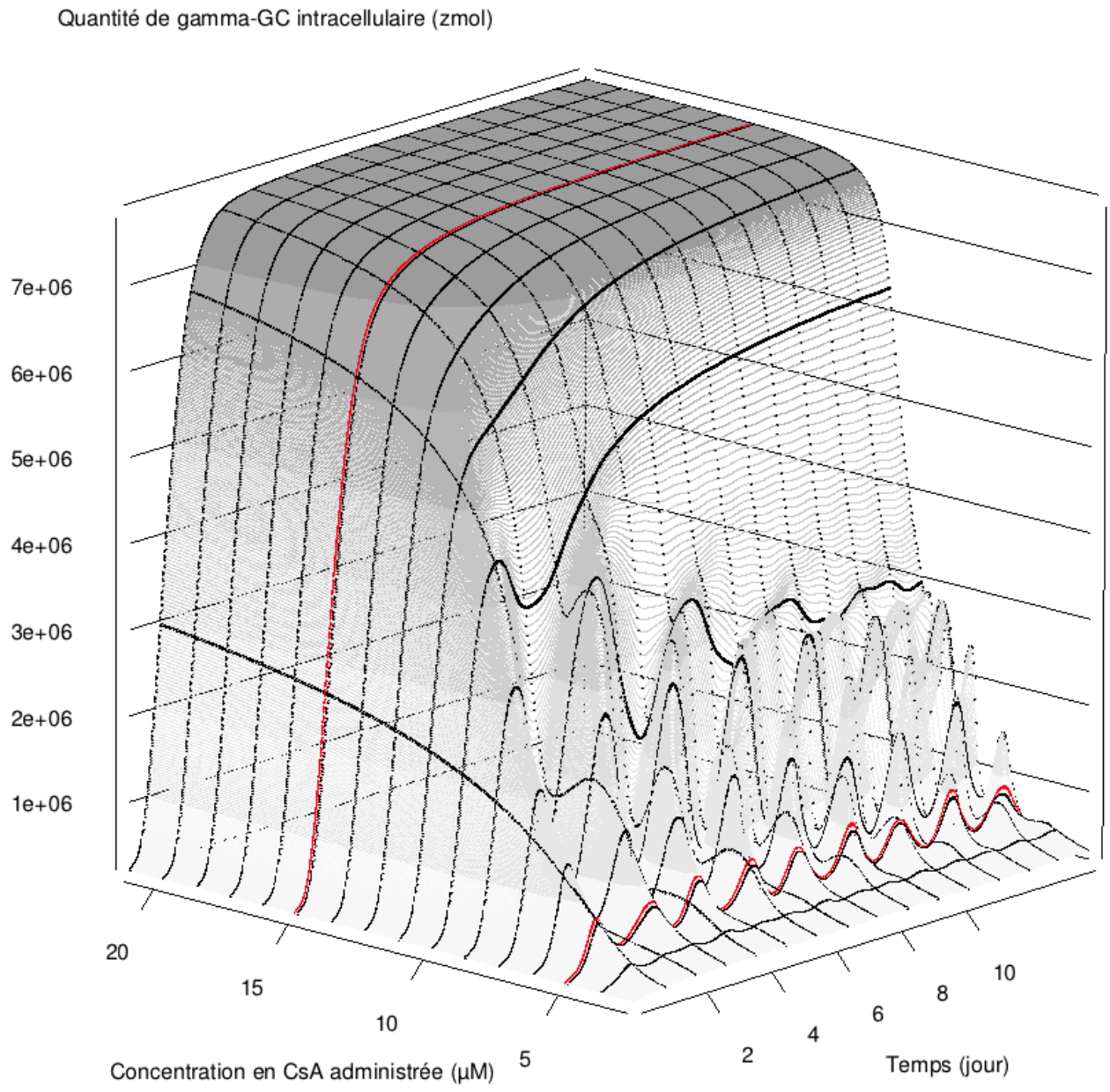


Figure 32 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de γ-GC, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du PES et ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

L'étude des quantités des différentes espèces du modèle en fonction de la concentration en CsA administrée, permet de supposer l'existence de seulement deux profils différents pour la plupart de celles-ci. Les deux profils sont ceux déjà observés à faible concentration (5 µM) et forte concentration (15 µM), c'est-à-dire de type oscillant pour le premier, et de type plateau pour le second. En effet, pour des concentrations en CsA administrée inférieures ou légèrement supérieures à 5 µM, les profils sont très proches et ne semblent pas tendre vers quelque chose de différent. De même, pour des concentrations en CsA administrée supérieures à 15 µM, le profil dit de type plateau reste constant et il semble que rien ne pourrait le perturber. Ainsi, concernant les omiques du modèle, il semblerait que le système ait déjà atteint ses limites dès la forte concentration. Il est d'ailleurs intéressant de noter que la concentration en CsA administrée, pour laquelle les profils finaux de type plateaux sont atteints, ne semble pas être exactement la même selon l'espèce étudiée. Concernant les ROS, il semblerait qu'il existe une concentration en CsA administrée critique pour laquelle le système n'arrive plus à les contenir. Dans le cas présent, cette concentration critique est environ égale à 10 µM.

Les Figures 33 et 34 représentent, respectivement à faible concentration et forte concentration, les prédictions obtenues pour le SES pour tous les omiques présents dans le modèle. De même que pour le PES, quelles que soient la durée d'observation et la concentration, toutes les variations des espèces observées (mise à part pour l'ARNm du CYP) suivent la même tendance. Ainsi, toutes les observations qui vont suivre sont valables pour tous les omiques étudiés.

Ce qui diffère principalement du PES, est le fait que quelle que soit la concentration (faible ou forte), les oscillations concernent toutes les courbes. Il n'existe pas de profil non oscillant. De plus, les périodes des oscillations semblent êtres égales pour toutes les courbes, que ce soit, là encore, à faible concentration ou à forte concentration. Cependant, comme pour le PES, les périodes des oscillations ne sont pas les mêmes entre la faible concentration et la forte concentration, et il n'est pas évident de déterminer la période exacte de ces dernières car, dès la faible concentration, il est difficile de définir précisément le nombre d'oscillations comprises dans une période.

Que ce soit à faible concentration ou forte concentration les données sont globalement bien prédites.

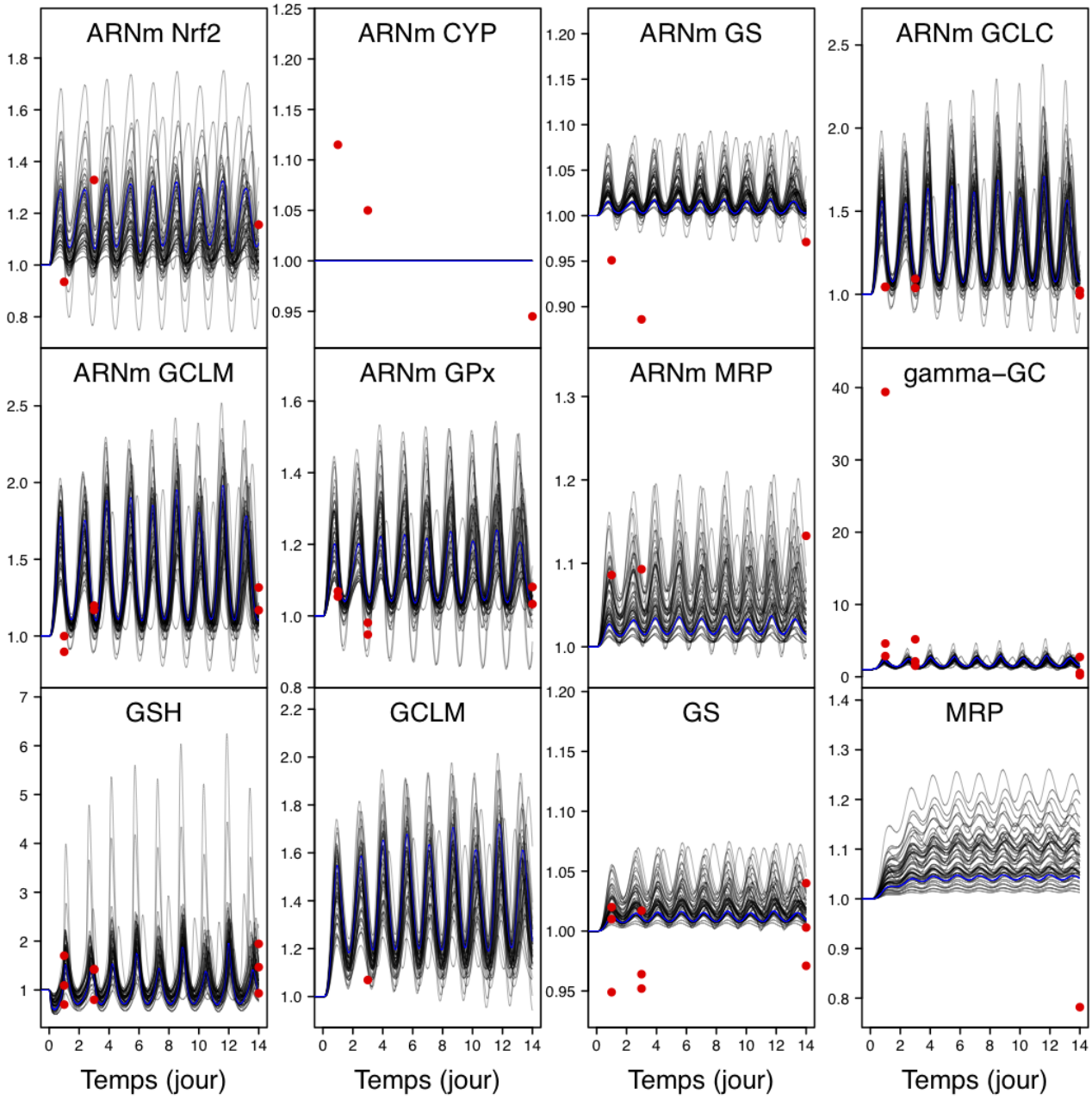


Figure 33 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*. Les cercles rouges représentent les données.

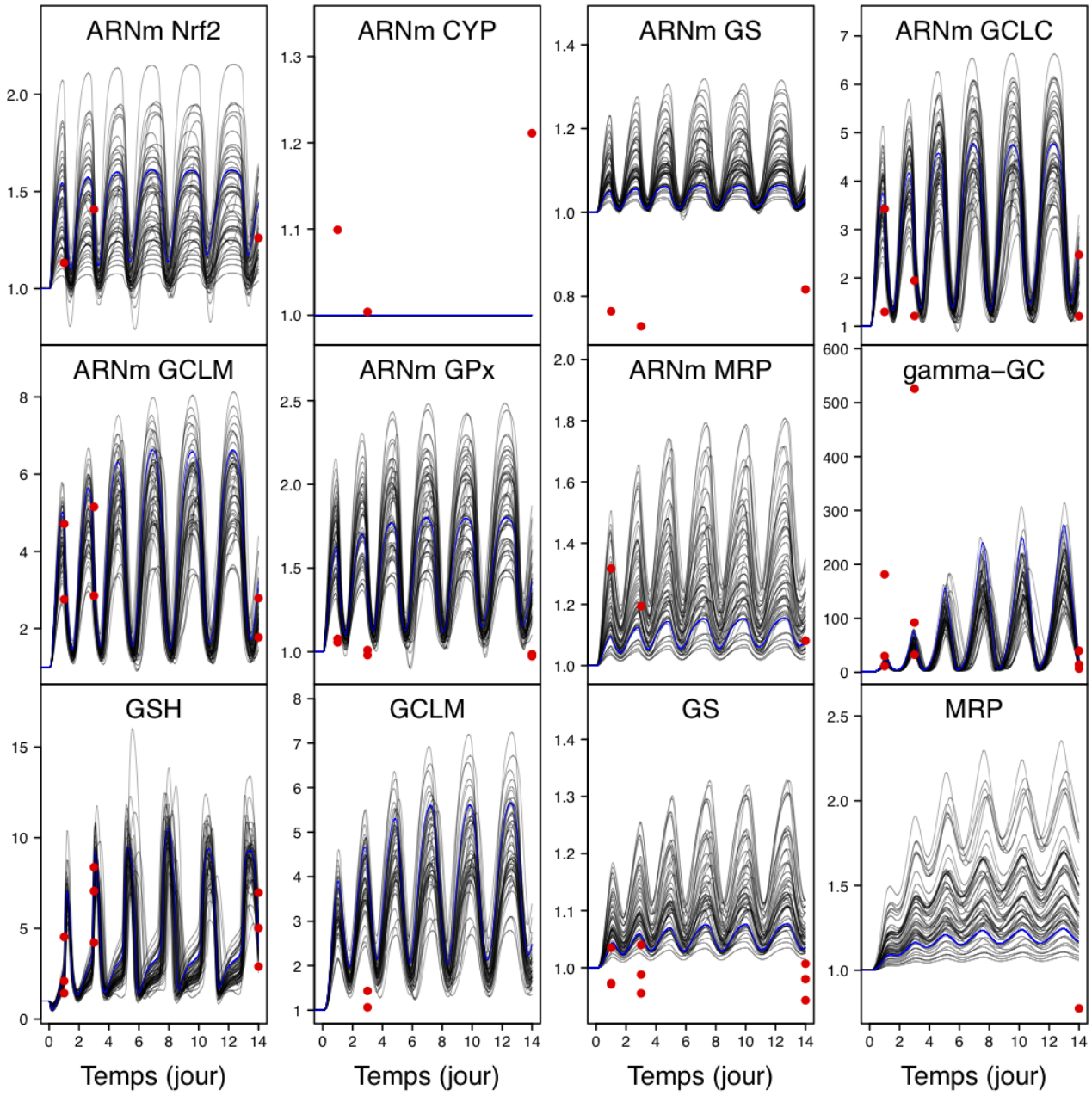


Figure 34 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*. Les cercles rouges représentent les données.

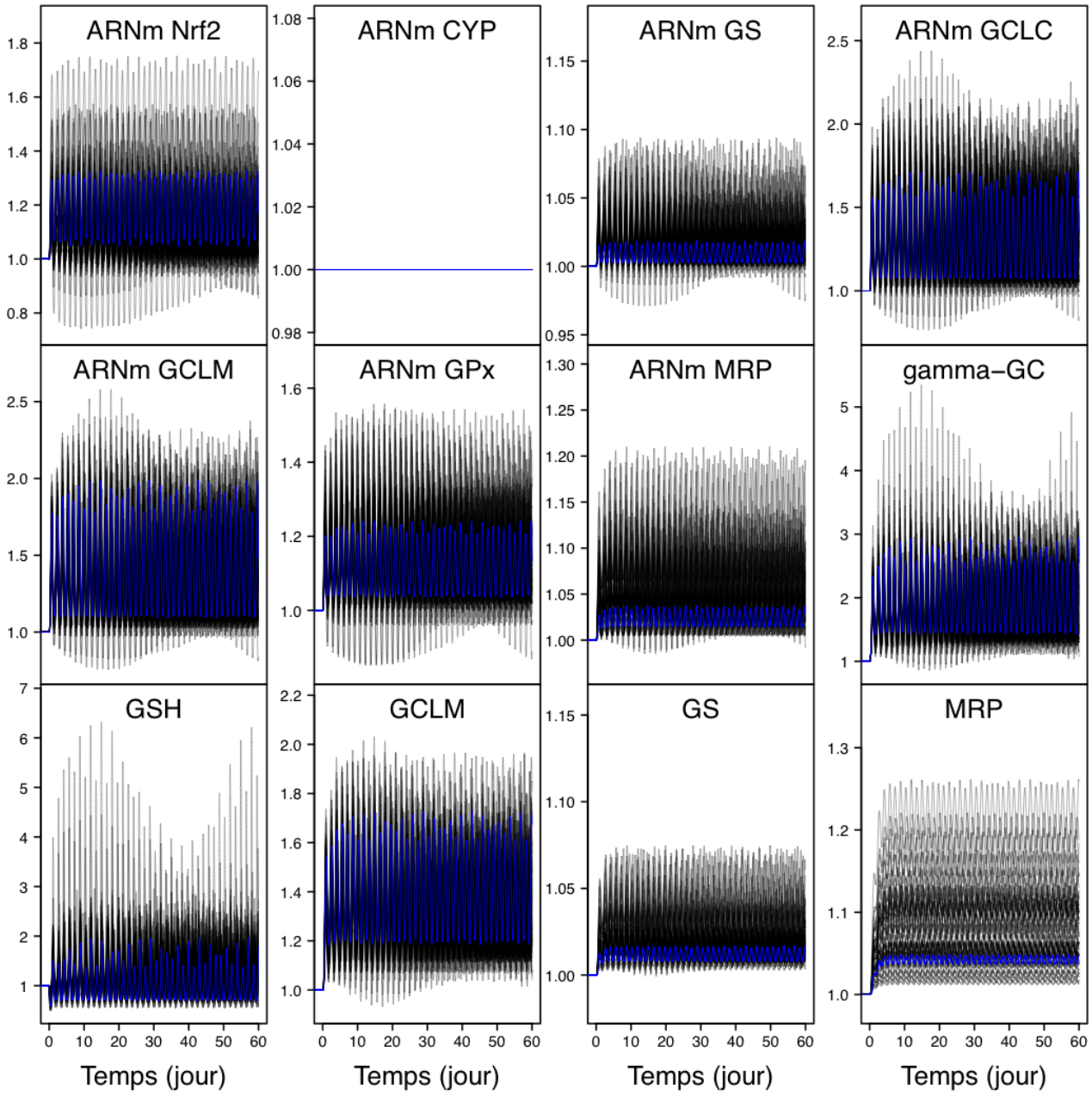


Figure 35 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori.*

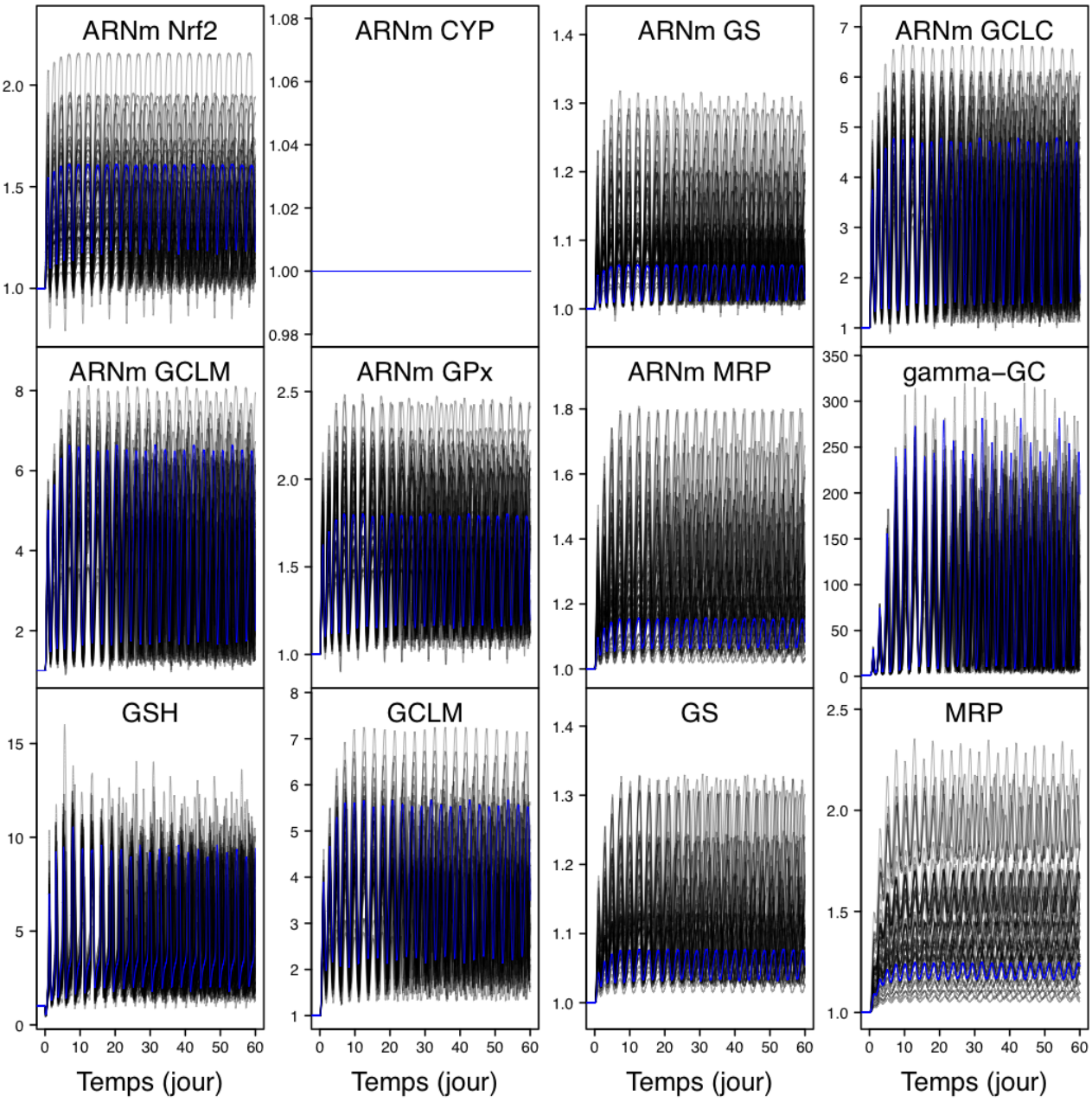


Figure 36 : Représentation graphique des FC des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

Les Figures 35 et 36, qui représentent le même type de résultats mais dont l'observation est étendue à 60 jours, nous permettent, comme pour le PES, de compléter la description des phénomènes précédemment observés. Concernant la faible concentration, l'observation des prédictions sur 60 jours permet de supposer l'existence d'un cycle lent qui prendrait plusieurs jours à se mettre en place. Ce phénomène n'est pas clairement visible pour toutes les espèces ni pour toutes les solutions. Pour les espèces concernées, le motif d'une période semble comprendre plusieurs oscillations et s'étendrait sur environ 20 jours. Concernant la forte concentration, il est difficile de compléter la description des prédictions sur 14 jours car, quelle que soit l'espèce observée, les oscillations, qu'elles soient prises indépendamment ou en groupe, ne semblent pas former de motifs particuliers. La seule information qu'il est possible de dégager de l'observation des prédictions concerne le nombre total d'oscillations, qui se trouve être plus important à faible concentration qu'à forte concentration. Cependant, cette information est déjà fournie par l'observation des prédictions sur 14 jours. Enfin, contrairement au PES, il est intéressant de remarquer l'absence de profil de type plateau à forte concentration.

Afin de vérifier si le même phénomène que celui observé pour le PES et impliquant la présence d'oscillations à dose zéro, est présent pour le SES, des simulations sans administration de CsA ont été réalisées, et sont regroupées dans les Figures 37 à 39.

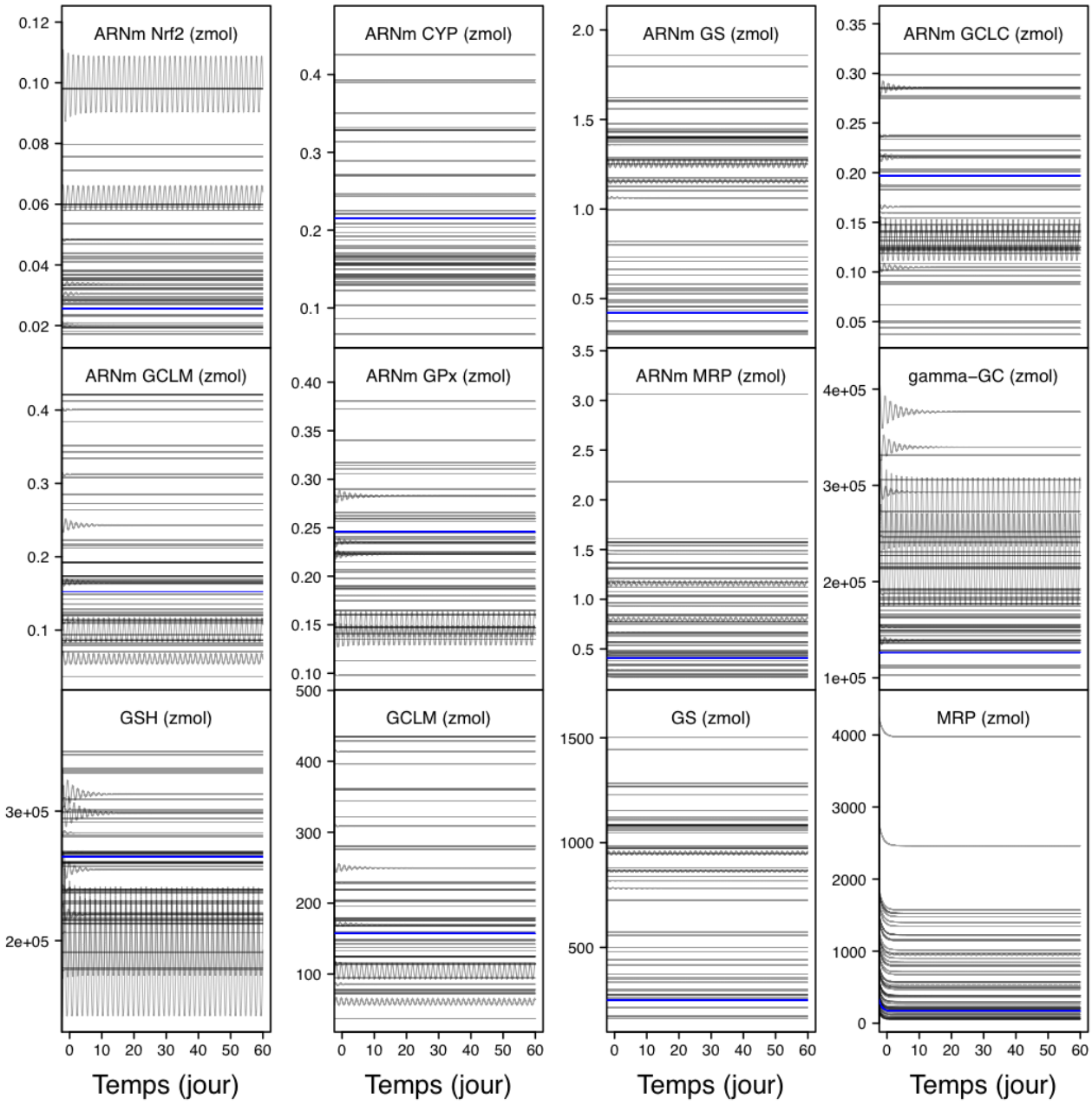


Figure 37 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et sans administration de CsA. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

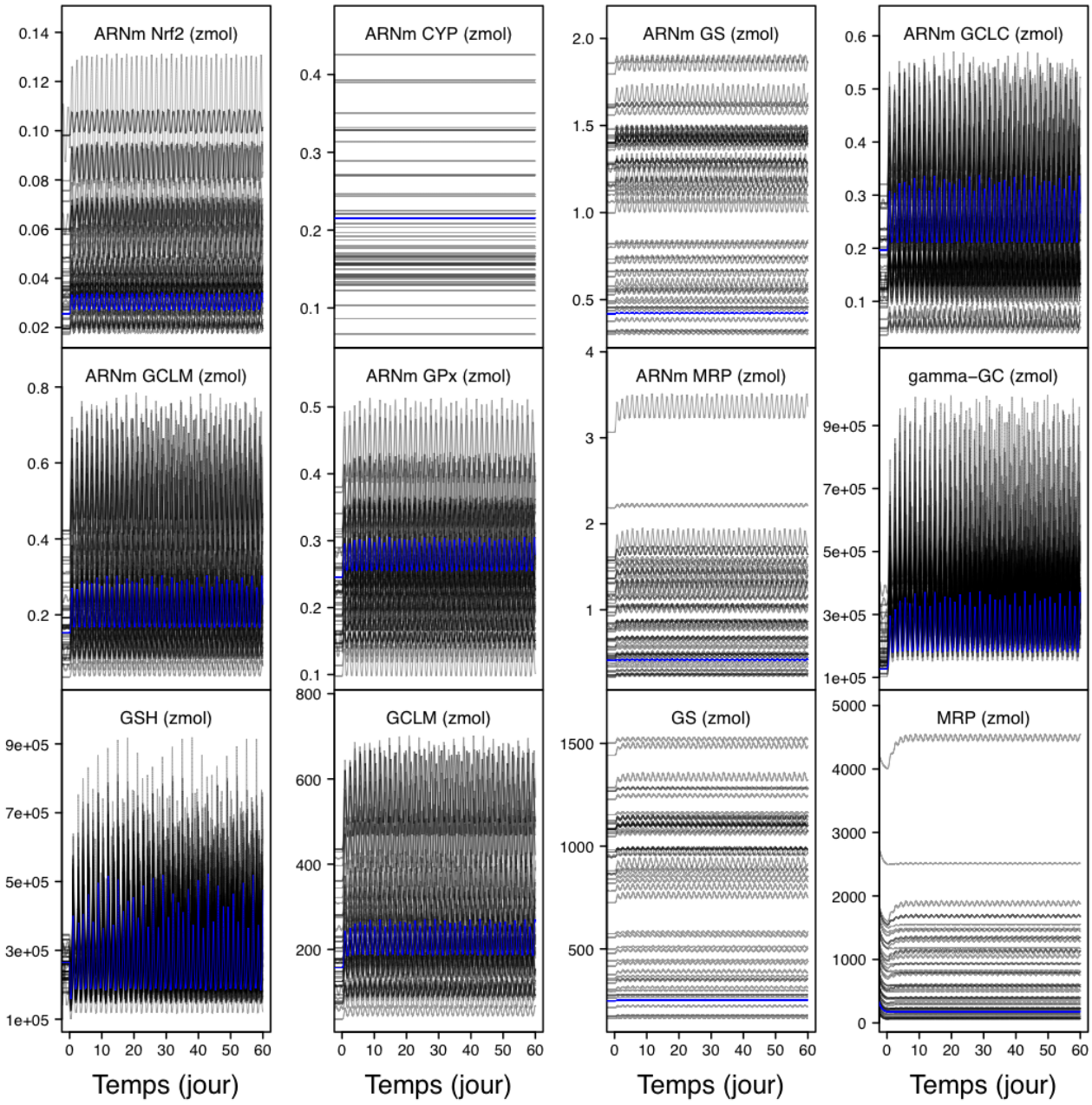


Figure 38 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM. Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

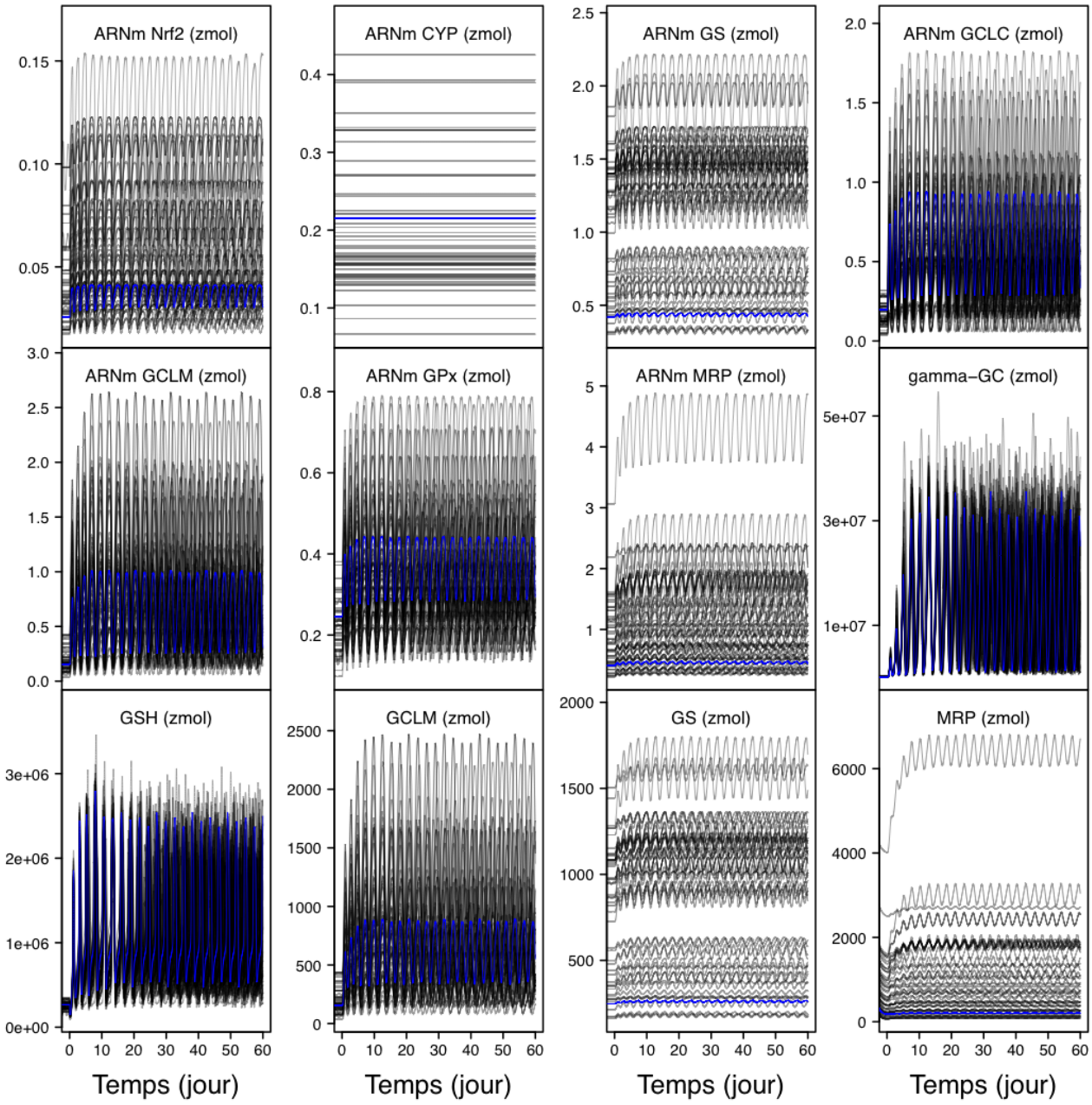


Figure 39 : Représentation graphique des quantités en ARNm du gène codant pour Nrf2, en ARNm du CYP3A5, en ARNm du GS, en ARNm du GCLC, en ARNm du GCLM, en ARNm du GPx, en ARNm du MRP, en gamma-GC, en GSH, en GCLM, en GS, et en MRP, au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 15 µM . Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

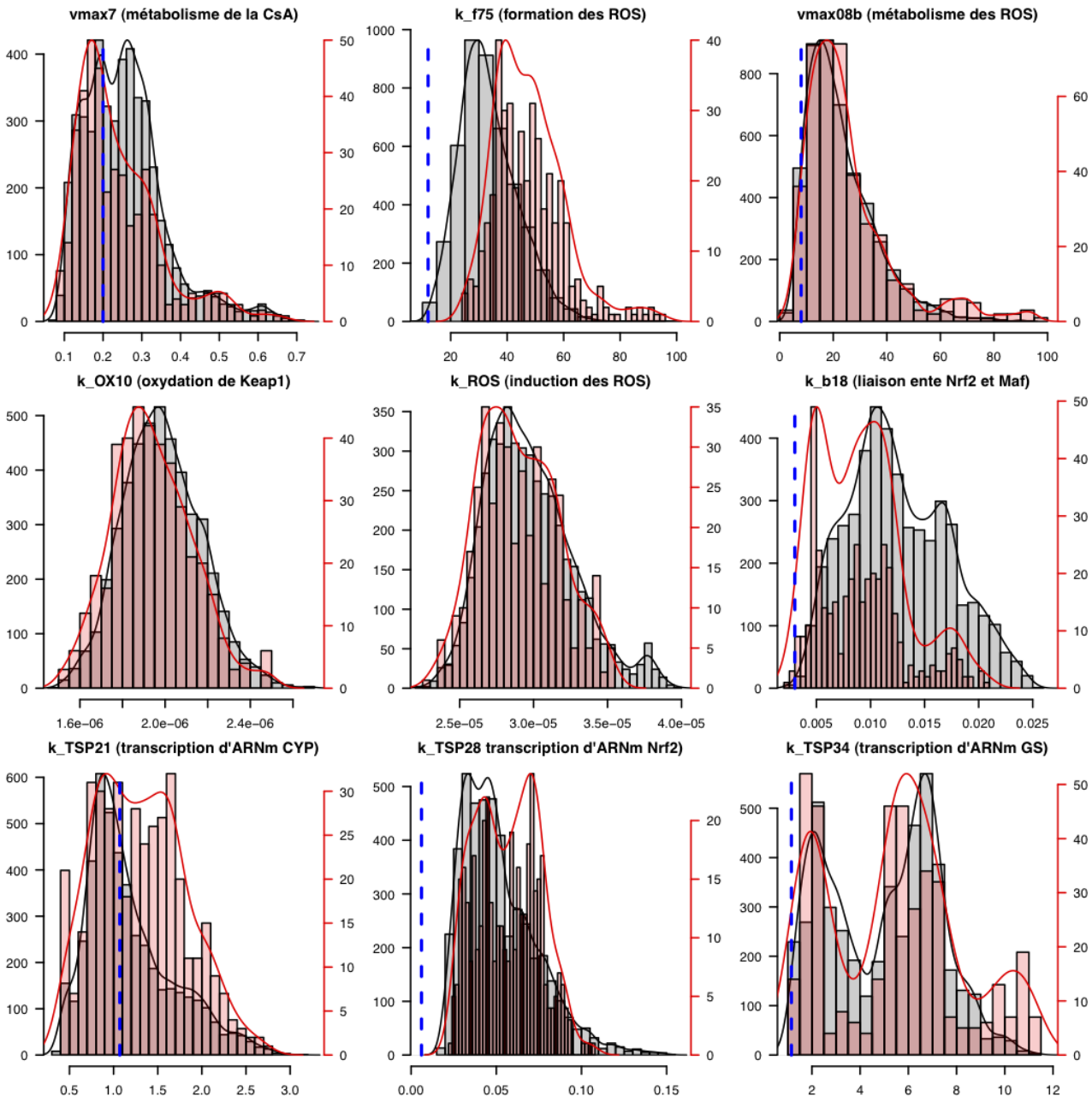


Figure 40a : Distributions *a posteriori* des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le second ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution *a priori*.

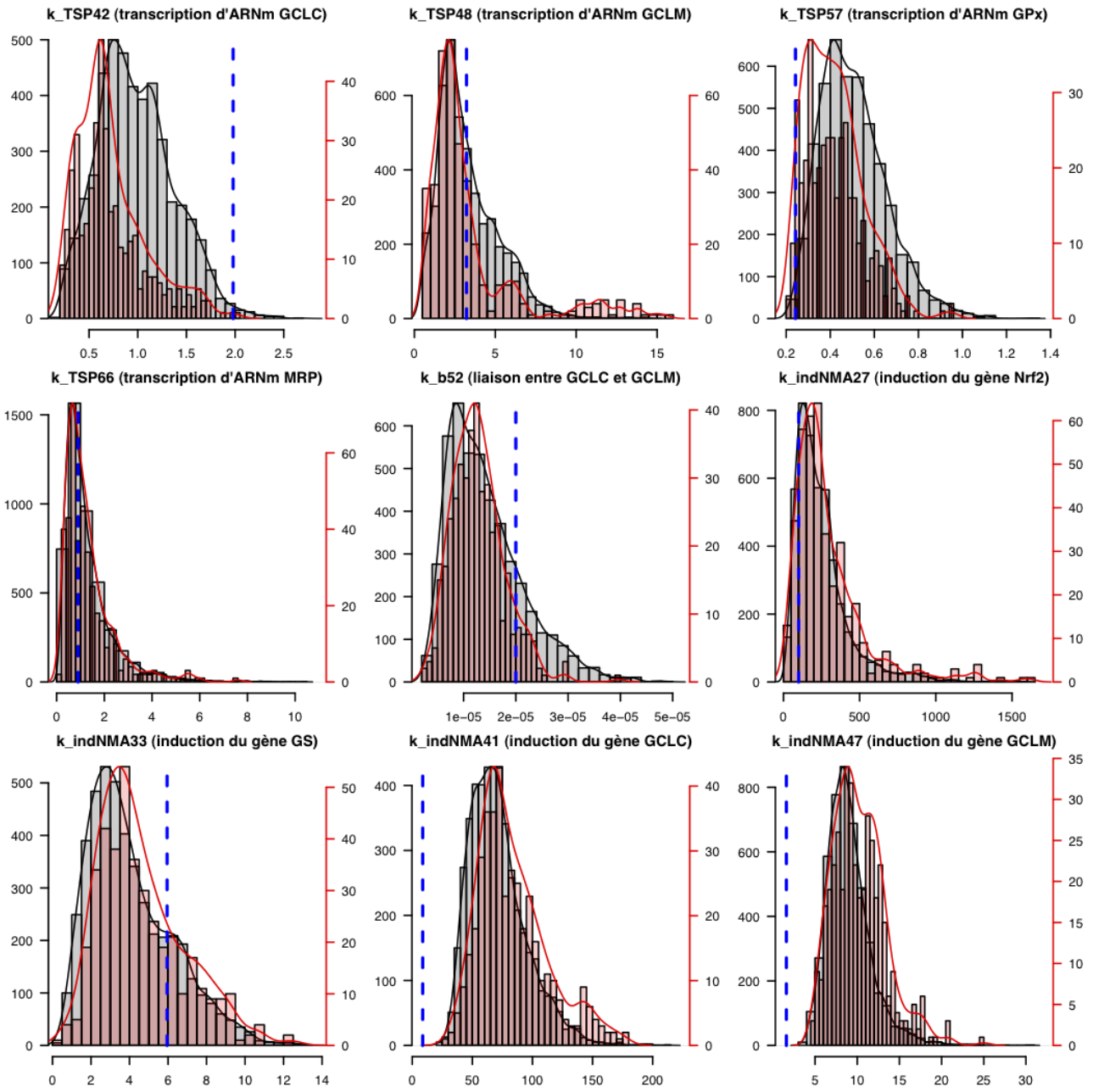


Figure 40b : Distributions *a posteriori* des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le second ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution *a priori*.

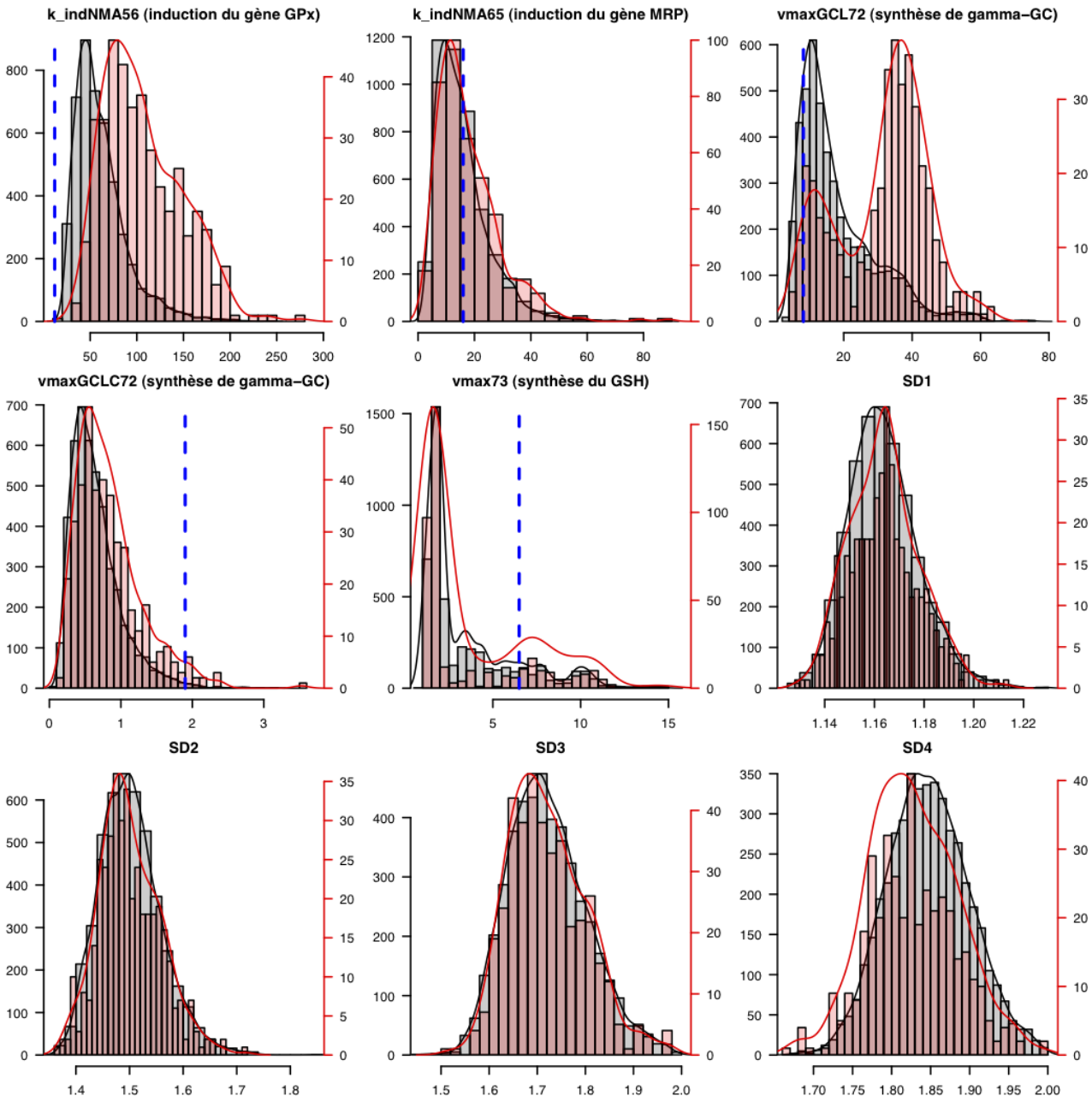


Figure 40c : Distributions *a posteriori* des paramètres statistiques et non statistiques estimés par MCMC, pour le second ensemble de solutions, pour les solutions présentant des oscillations à dose zéro (en rouge) et pour les solutions ne présentant pas d'oscillations à dose zéro (en noir). La ligne en pointillé bleue correspond à la valeur utilisée pour la moyenne de la distribution *a priori*.

Comme pour le PES, les résultats ne sont pas présentés sous forme de FC dans les Figures 37 à 39, et comme pour le PES, on retrouve la présence d'oscillations à dose zéro pour quelques rares courbes. Cependant, contrairement au PES, il est difficile de conclure quant à leur influence sur le système, car à forte concentration toutes les solutions présentent des oscillations. Il n'est donc pas évident de savoir si il existe un phénomène d'addition entre les oscillations présentes à dose zéro et celles retrouvées à forte concentration. De même que pour le PES, afin de trouver le ou les paramètre(s) responsable(s) de ces oscillations à dose zéro, et afin de vérifier si ce sous-ensemble de solutions présente un intérêt plus grand, une nouvelle étude de la distribution a posteriori des paramètres a été réalisée. Dans cette étude, les paramètres des solutions présentant des oscillations à dose zéro ont été séparés des paramètres des autres solutions.

Contrairement au PES, l'analyse de ces distributions a posteriori se révèle être moins évidente car plusieurs paramètres présentent une distribution a posteriori bi-modale. De plus, l'implication des paramètres contrôlant la formation et l'induction des ROS n'est pas aussi visible que pour le PES. Enfin, le fait que la distribution a posteriori de l'erreur de mesure sur les données omiques soit centrée sur une valeur légèrement inférieure pour les paramètres des solutions présentant des oscillations à dose zéro, est un élément à discuter.

Les Figures 41 à 44 illustrent l'évolution des quantités intracellulaires de ROS et intranucléaires de Nrf2 à faible et forte concentration, pour le SES.

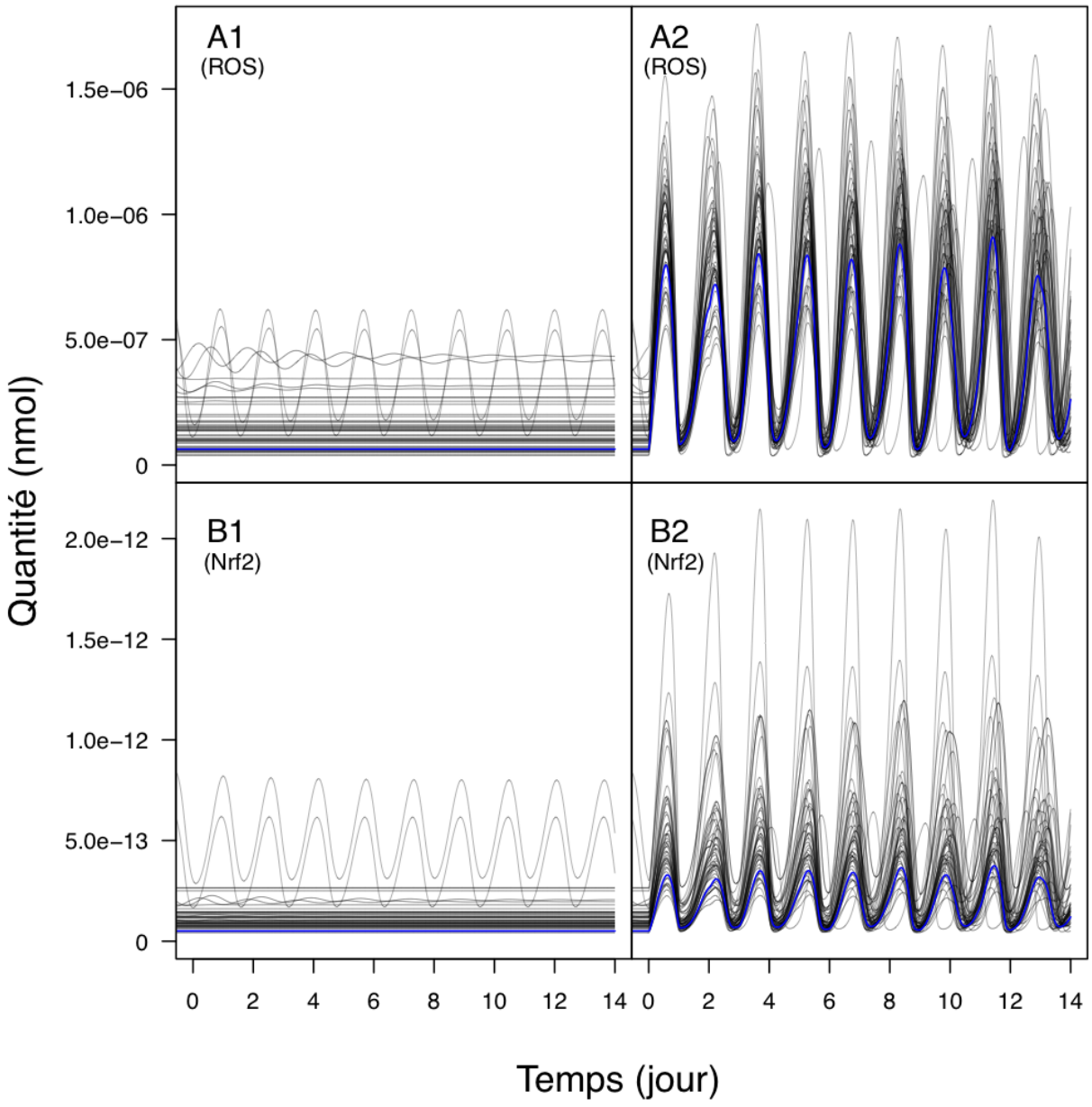


Figure 41 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A2 et B2), et sans administration de CsA (A1 et B1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le second ensemble de solutions. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du second ensemble de solutions, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

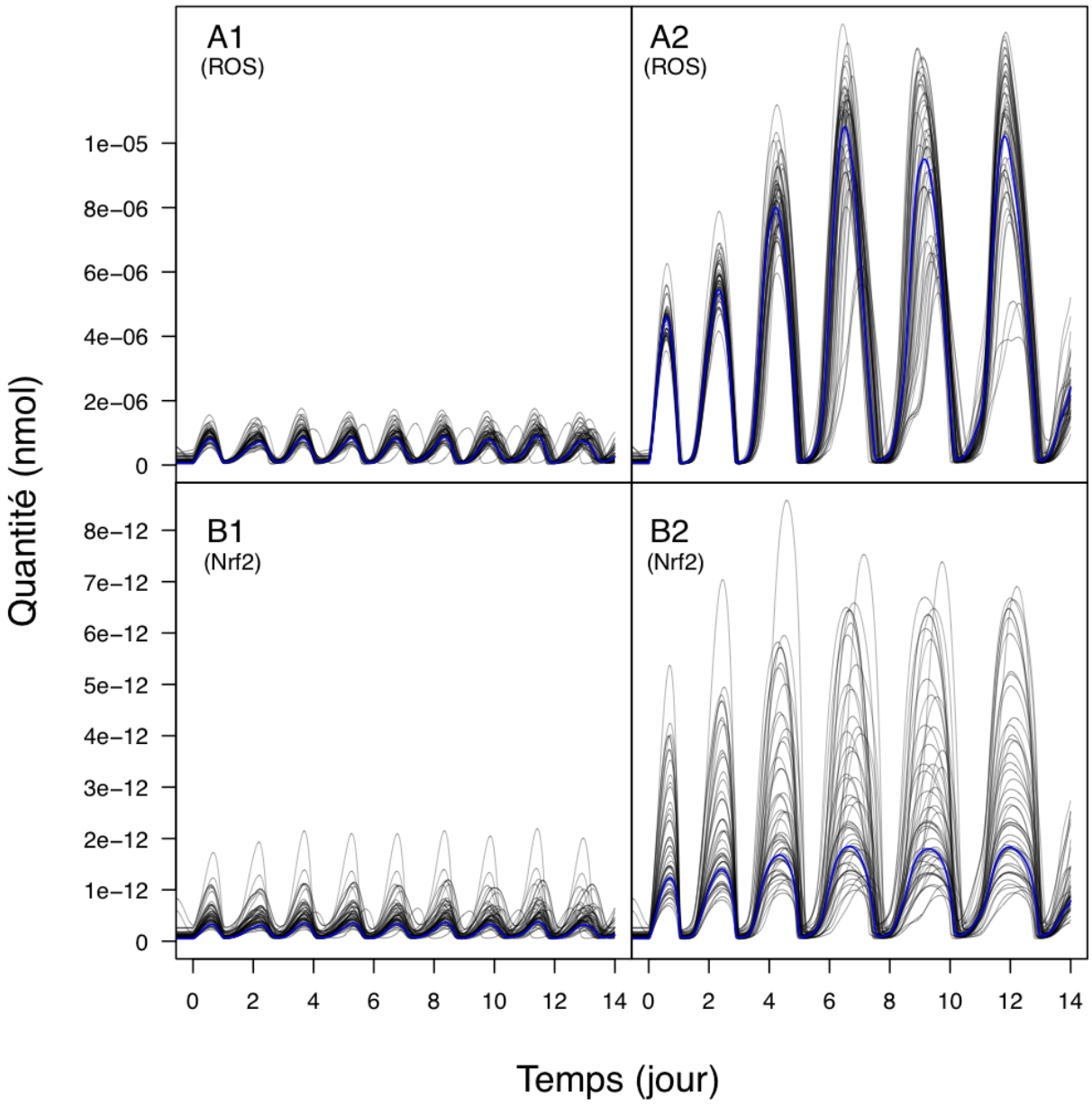


Figure 42 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 14 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A1 et B1), et 15 µM (A2 et B2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le SES. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du SES, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

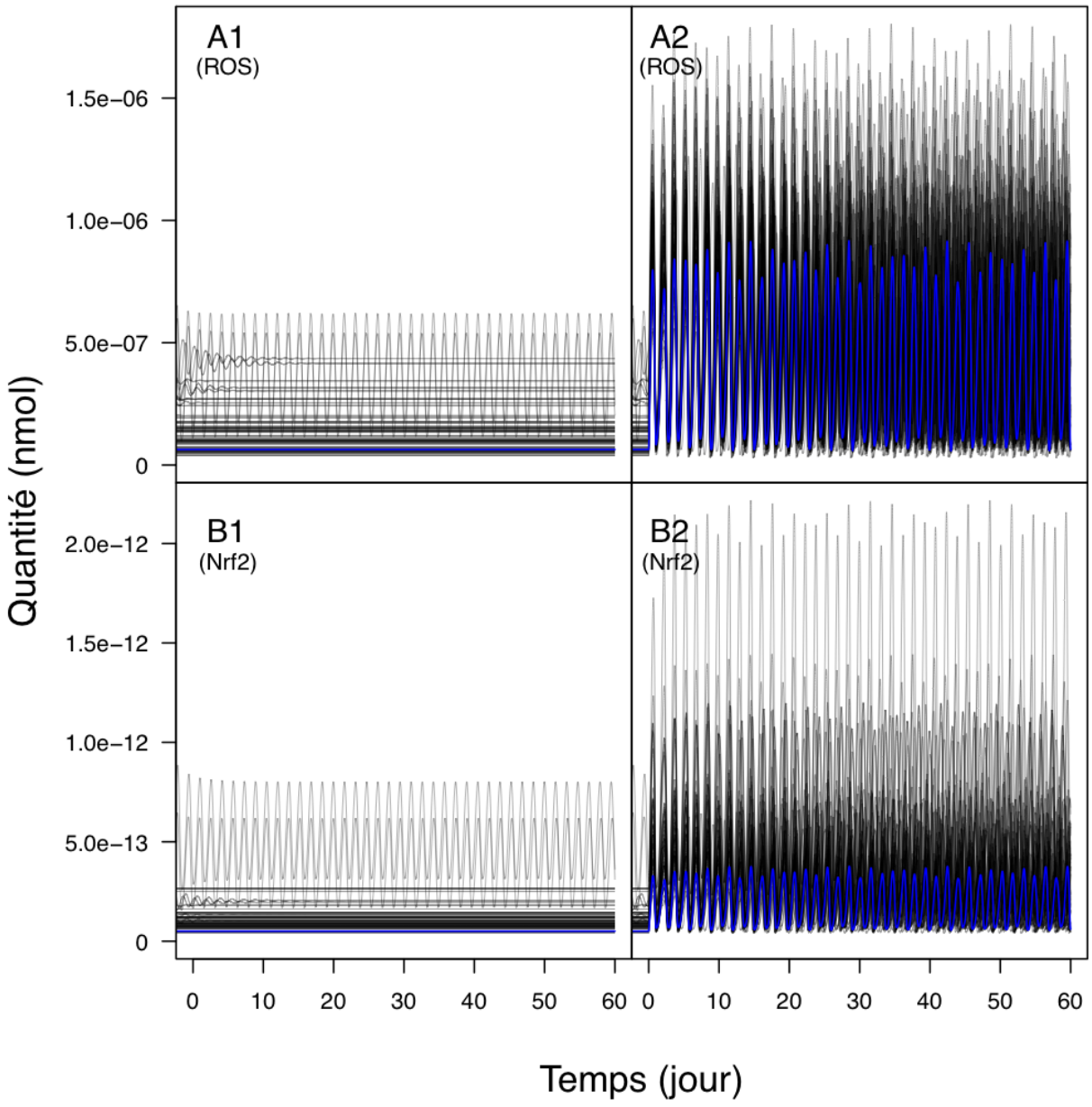


Figure 43 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A2 et B2), et sans administration de CsA (A1 et B1). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le SES. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du SES, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

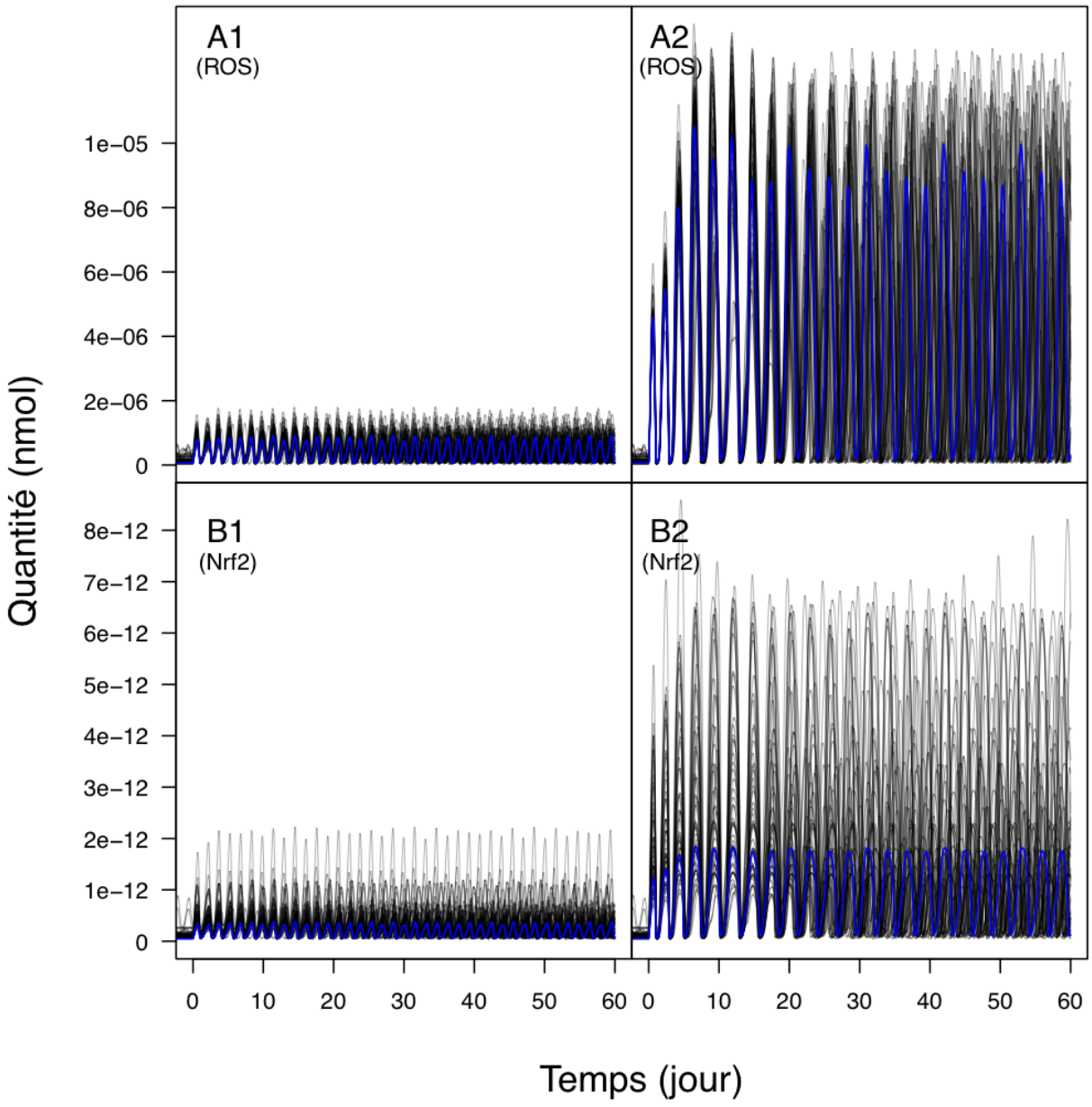


Figure 44 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS (A1 et A2) et intranucléaires de Nrf2 (B1 et B2), au cours du temps (sur 60 jours), et pour une administration à doses répétées de CsA à 5 µM (A1 et B1), et 15 µM (A2 et B2). Les courbes noires représentent les prédictions réalisées à partir de 49 vecteurs de paramètres tirés au hasard dans le SES. La courbe bleue correspond à la « meilleure » prédiction du SES, réalisée à partir du vecteur de paramètres ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

Les profils des courbes sont très proches et semblent être similaires à ceux rencontrés précédemment pour le même ensemble de solutions (figures 37 à 39). Cependant, ils se révèlent être très différents de ceux observés pour le PES. En effet, pour la forte concentration, les quantités intranucléaires en Nrf2 ne se stabilisent pas à un plateau et les quantités intracellulaires des ROS sont contenues et sont présentes sous forme d'oscillations. Cette différence est très importante à prendre en compte et sera discutée par la suite, car la quantité intracellulaire des ROS est représentative du stress oxydant, et elle est souvent caractéristique de l'état général d'une cellule. Le fait que la quantité des ROS soit sous contrôle ou explose a donc une influence majeure sur la survie de la cellule.

Les Figures 45 à 49 regroupent les résultats obtenus en modifiant la concentration en CsA administrée. Les simulations qui vont suivre ont été réalisées en utilisant un seul vecteur de paramètre (le plus probable). Comme pour le PES, d'autres simulations ont été réalisées en utilisant un vecteur de paramètre présentant des profils oscillants à dose zéro (sans administration de CsA). Comme expliqué précédemment, ces oscillations à dose zéro ne semblent avoir aucune influence sur le système. Comme pour le PES, cette hypothèse est maintenant confirmée, car les prédictions obtenues en utilisant le vecteur de paramètre présentant des profils oscillants à dose zéro, sont similaires à celles obtenues en utilisant un vecteur de paramètre (vecteur le plus probable) ne présentant pas d'oscillations à dose zéro. Ainsi, seuls les résultats obtenus en utilisant le vecteur le plus probable seront présentés. Enfin, tous les résultats obtenus pour les espèces du modèle ne sont pas présentés, car pour la plupart de celles-ci, ils sont similaires. Ainsi, seuls cinq espèces sont représentées car les résultats concernant la GS, la GCL, la GPx, la GCLM et la GCLC sont très proches, si ce n'est identique, en termes de profils des courbes (les valeurs, quant à elles, sont différentes d'une espèce à l'autre).

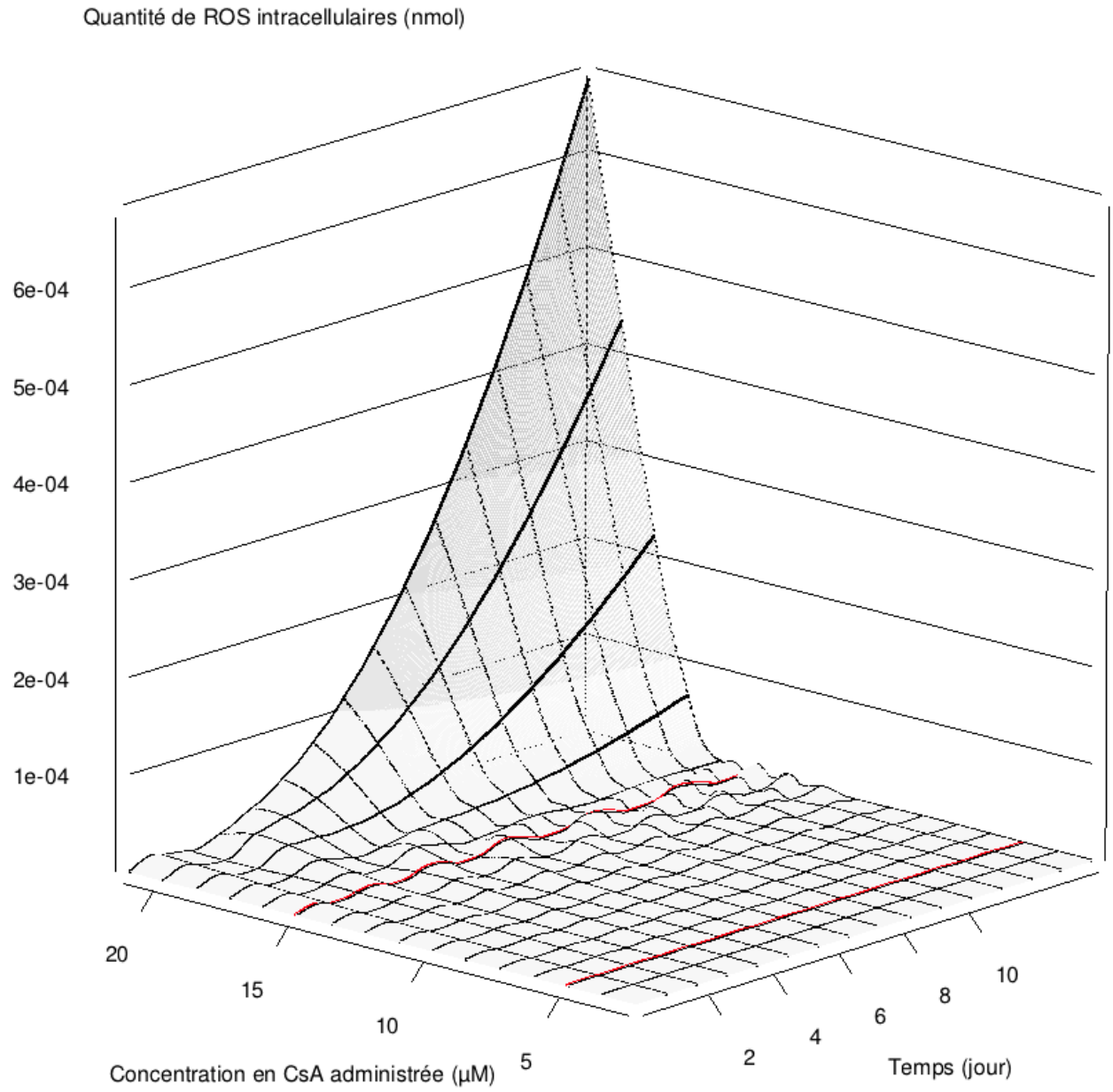


Figure 45 : Représentation graphique des quantités intracellulaires des ROS, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

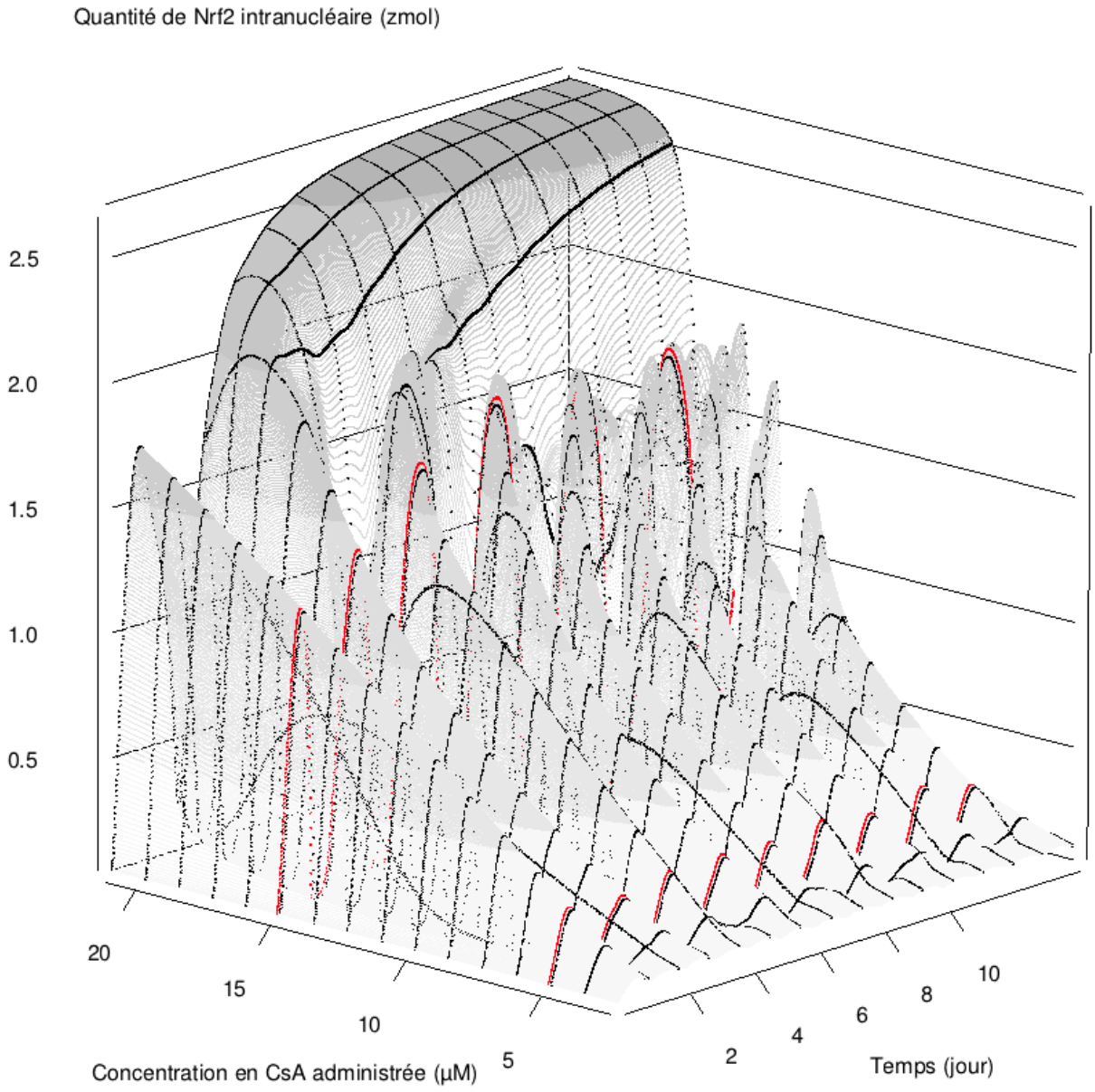


Figure 46 : Représentation graphique des quantités intranucléaires de Nrf2, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

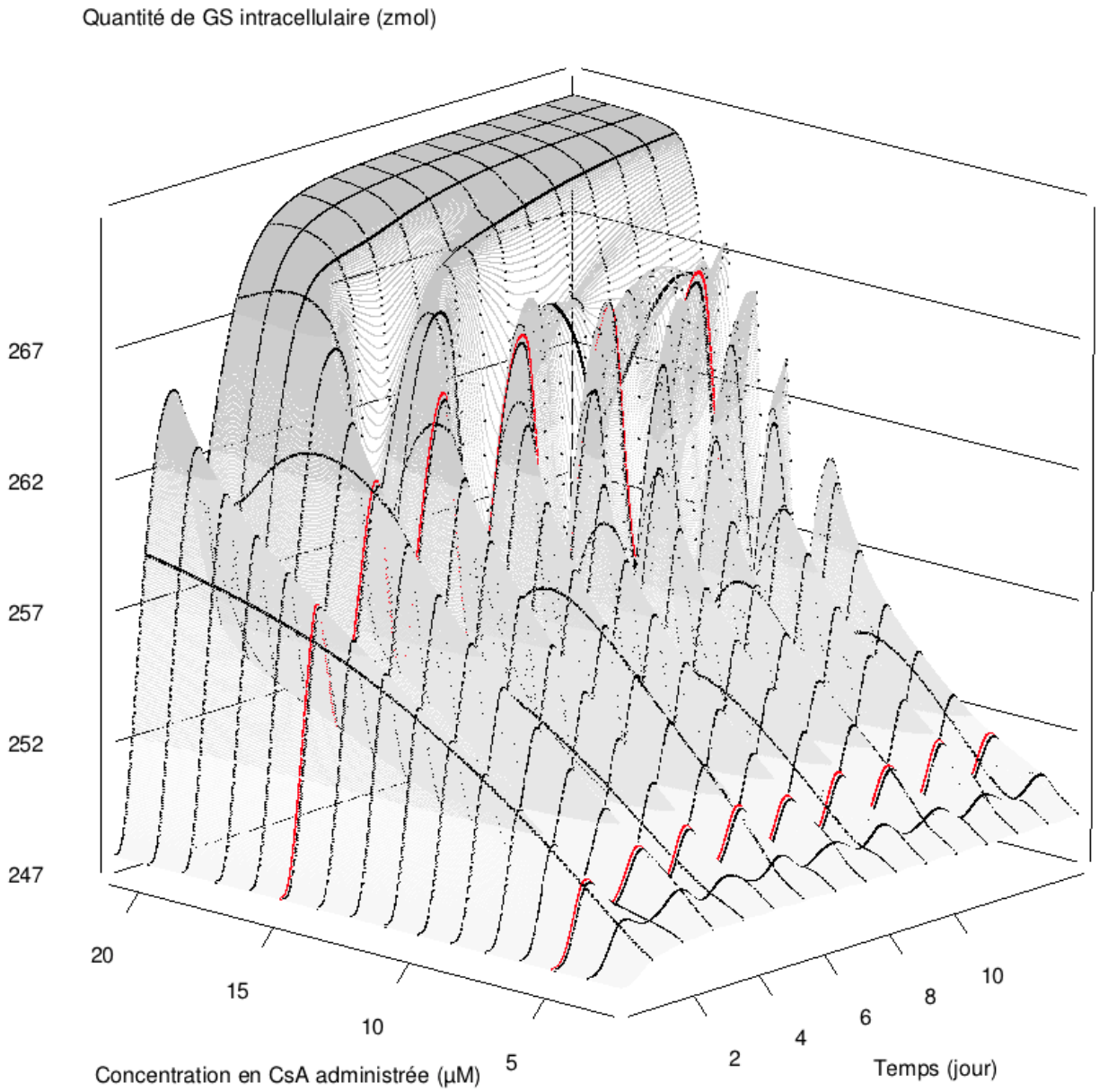


Figure 47 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de GS, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

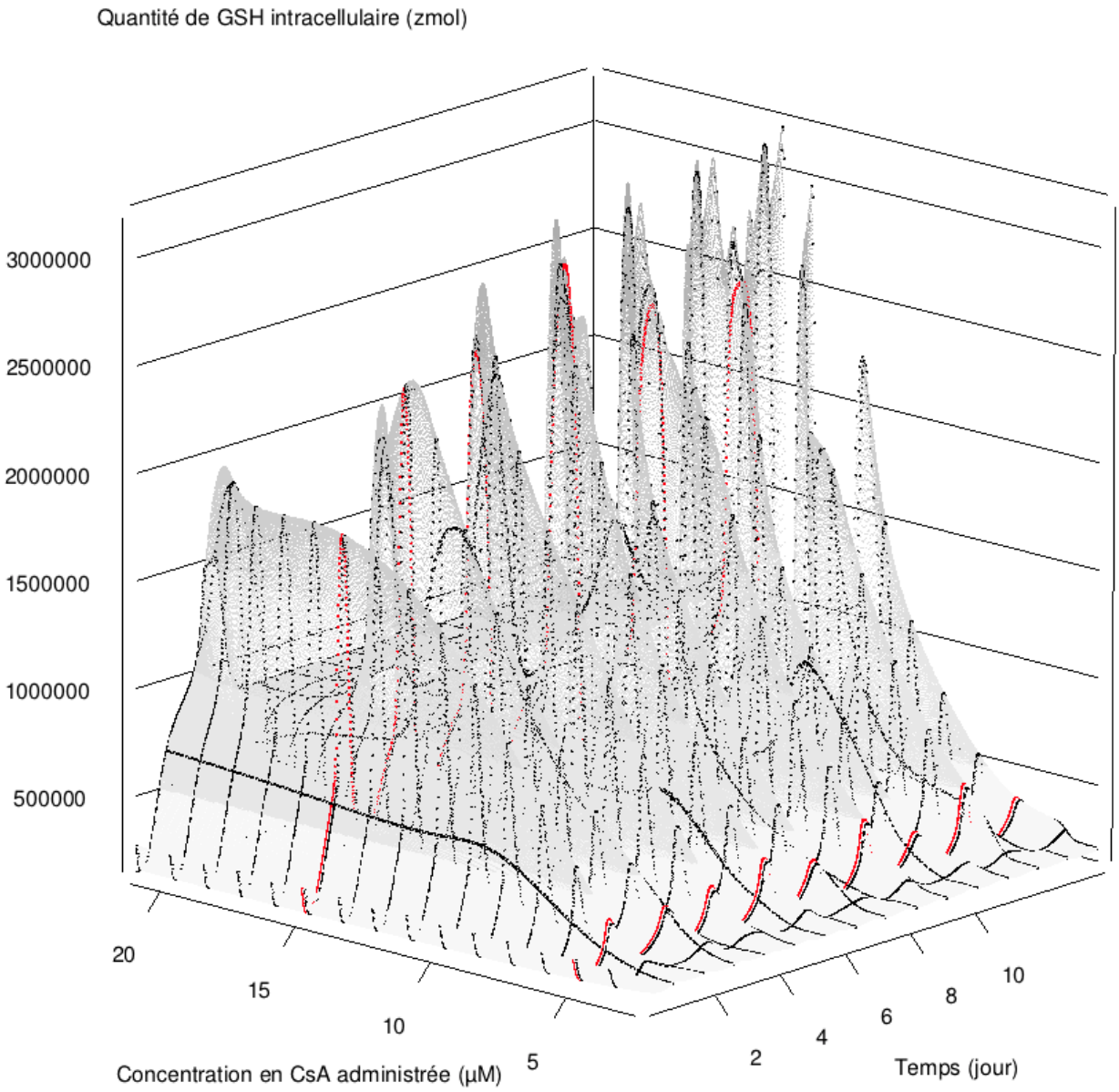


Figure 48 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de GSH, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

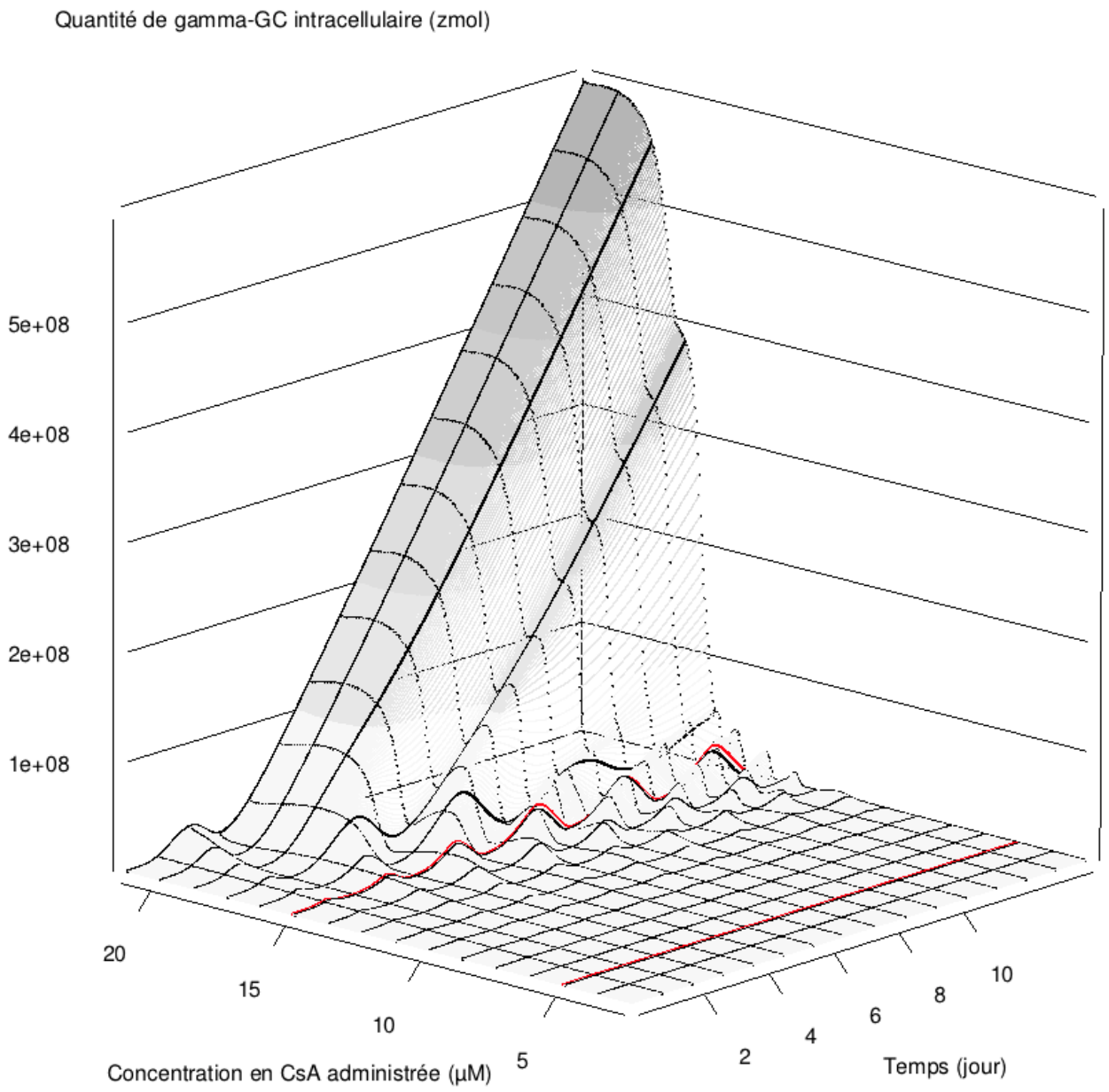


Figure 49 : Représentation graphique des quantités intracellulaires de γ-GC, au cours du temps (sur 14 jours), et en fonction de la concentration de CsA administrée (en doses répétées). Les courbes rouges (concentrations utilisées pour générer les données) ainsi que la surface grise, représentent les prédictions réalisées à partir du vecteur de paramètres issu du SES et ayant la plus grande densité de probabilité *a posteriori*.

Comme pour le PES, l'étude des quantités des différentes espèces du modèle en fonction de la concentration en CsA administrée, permet de supposer l'existence de seulement deux profils différents pour la plupart de celles-ci. Cependant, contrairement au PES, les deux profils ne sont pas ceux déjà observés à faible concentration (5 µM) et forte concentration (15 µM). En effet pour le SES, la faible et la forte concentration se retrouvent toutes les deux dans la catégorie présentant un profil de type oscillant. Les profils de type plateau ne sont visibles que pour des concentrations en CsA administrée supérieures à environ 17 µM. D'autres éléments qui divergent des résultats obtenus avec le PES sont à signaler :

- pour la gamme de concentrations en CsA administrée utilisée, les courbes de type plateau sont systématiquement précédées d'une unique oscillation,

- pour les quantités de GSH, la valeur atteinte par les plateaux est inférieure aux maximums des oscillations,
- pour les quantités de γ-GC, aucun plateau n'est atteint après 14 jours, et pour des concentrations en CsA administrée supérieures à 16-17 µM, le profil des courbes semble être de type linéaire (donc différent de celui rencontré pour les autres omiques, mais aussi différent de celui rencontré pour les ROS).

L'allure générale des résultats concernant les quantités des ROS est proche de celle retrouvée pour le PES. Elle est composée d'une zone comportant des courbes faiblement oscillantes et d'une zone composée de courbes de type puissance de plus en plus pentues. La différence entre les deux ensembles de solutions se trouve dans la valeur de la concentration en CsA administrée pour laquelle le système s'emballe et n'est plus sous contrôle (valeur critique). En effet, cette valeur, qui est supérieure à celle retrouvée pour le PES, est environ égale à 16 µM.

Dans les représentations graphiques des quantités en γ-GC, au cours du temps et en fonction de la concentration en CsA administrée (Figures 32 et 49), on observe deux profils différents selon l'ensemble de solutions utilisé. Lorsque le PES est utilisé, le même plateau que pour les autres omiques est observé pour des concentrations en CsA administrée supérieures à 10 µM. Alors que lorsque le SES est utilisé, ce plateau n'est plus présent. En réalité, l'absence de ce plateau s'explique par la structure particulière du modèle concernant la synthèse et l'élimination de γ-GC. En effet, contrairement à la grande majorité des autres espèces du modèle, γ-GC ne possède pas d'équation permettant une dégradation naturelle de la molécule (très souvent modélisée par une équation

d'ordre un). Les quantités de γ-GC sont contrôlées par deux équations, une « d'entrée » et une « de sortie ». La première correspond à sa formation à partir de glutamine, cystéine et ATP via la GCLC et la GCL, et la seconde correspond à sa transformation en GSH par l'intermédiaire de la GS. Or, cette seconde équation n'est pas simplement d'ordre un, mais de type Michaelis-Menten. La particularité des équations de type Michaelis-Menten est qu'elles possèdent le même comportement que des équations d'ordre un pour des valeurs faibles et le même comportement que des équations d'ordre zéro pour des valeurs élevées. Pour des quantités de γ-GC très importantes (supérieures à la constante de Michaelis), cette équation devient donc d'ordre zéro, et l'élimination de γ-GC n'étant contrôlée que par cette équation, c'est donc le mécanisme complet d'élimination qui devient d'ordre zéro. Une équation d'ordre zéro n'est pas proportionnelle à la variable étudiée. Ainsi, dans le cas où l'équation « de sortie » d'un système est d'ordre zéro, elle ne permet pas à ce système de se stabiliser à un plateau et ce, quelle que soit la forme de l'équation utilisée « en entrée ». Pour le PES, les quantités de γ-GC restent inférieures à 8.10^7 zmol, même pour des concentrations en CsA administrée importantes. Pour le SES, les quantités de γ-GC dépassent les 10^8 zmol lorsque les profils linéaires apparaissent. Ainsi on peut supposer que la valeur de la constance de Michaelis de l'équation d'élimination de γ-GC se situe aux alentours de 8 ou 9.10^7 zmol. Cette valeur est en fait difficile à vérifier ou confirmer car la forme complète de l'équation modélisant l'élimination de γ-GC est bien de type Michaelis-Menten, mais elle possède une forme modifiée et complexe de l'équation de Michaelis-Menten. Enfin, la différence entre les niveaux atteints par les quantités de γ-GC selon l'ensemble de solutions utilisé, peut s'expliquer par la structure, là aussi particulière, de l'équation modélisant la formation de γ-GC. En effet, dans cette dernière, la quantité de GSH joue un rôle important puisqu'elle inhibe la formation de γ-GC. Ainsi, plus les valeurs de GSH atteindront un niveau d'équilibre élevé, plus le GSH inhibera la formation de γ-GC. On retrouve bien cette différence dans les résultats obtenus puisque les valeurs de GSH atteignent un niveau d'équilibre plus bas pour le SES que pour le PES (ceci s'expliquant par le fait que les deux ensembles de solutions ne possèdent pas les mêmes distributions pour certains paramètres, et en particulier, pour ceux contrôlant la synthèse de GSH et l'induction du gène codant pour GPx). On pourrait donc qualifier le profil de γ-GC de « formation-dépendant » pour le PES et « d'élimination-dépendant » pour le SES.

Enfin, ayant supposé la présence, dans le modèle de PK *in vitro*, d'un mécanisme d'efflux saturable, il serait intéressant d'ajouter au modèle une ou des équations correspondant au transporteur d'efflux, ainsi qu'à la voie de signalisation conduisant à la synthèse de ce transporteur. La CsA est connue comme étant à la fois un substrat et un inhibiteur de la Pgp [59], ainsi le

phénomène d'accumulation cellulaire retrouvé dans les expérimentations i*n vitro* pourrait être dû à une inhibition ou une saturation de la Pgp par la CsA. Durant la conception du modèle PK *in vitro*, une simple équation de Michaelis-Menten avec un seul vmax et un seul Km a été choisie pour modéliser la sortie de la CsA hors de la cellule. Ainsi, en plus d'ajouter des équations permettant de prendre en compte la synthèse et la présence de la Pgp dans la cellule, il serait probablement intéressant de revoir la forme de l'équation modélisant la sortie de la CsA hors de la cellule, afin de prendre en compte à la fois le phénomène de saturation (déjà présent) et celui d'inhibition.

4.3. Modèle PBPK

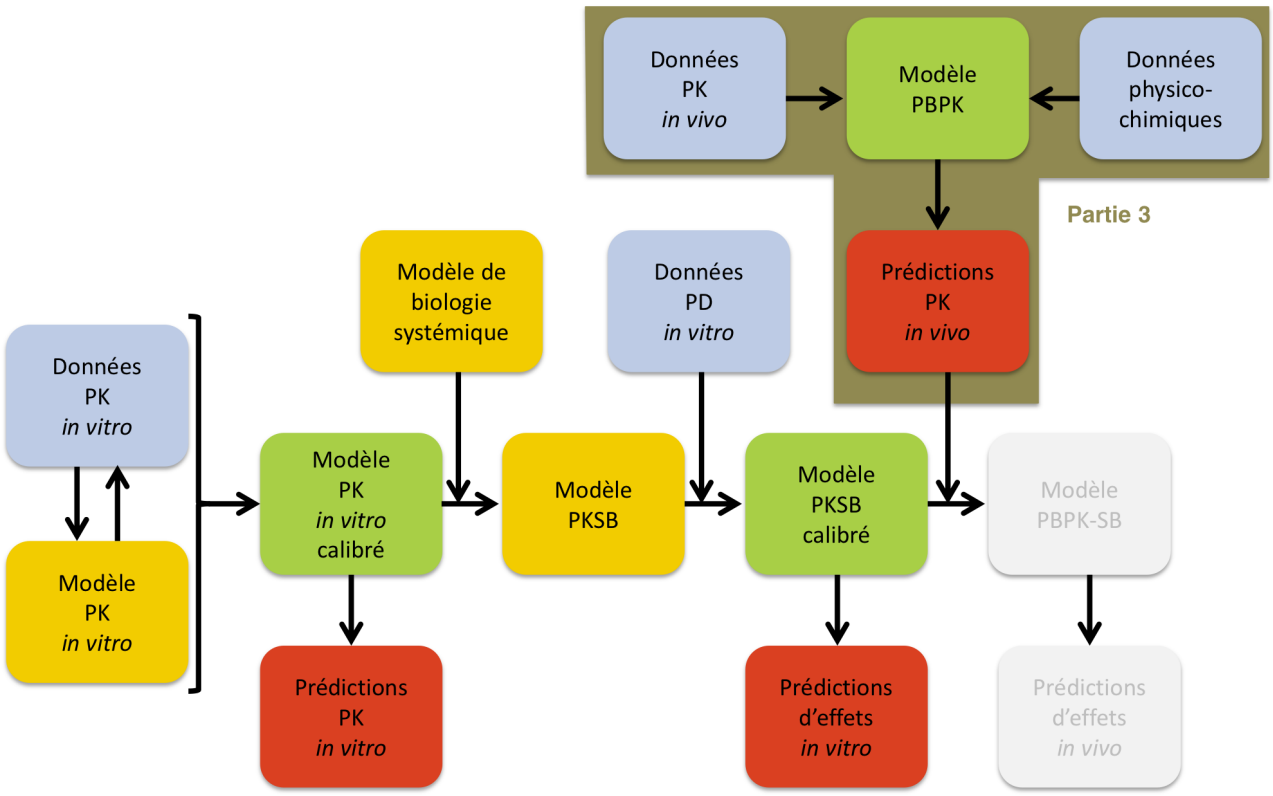


Figure 50 : Présentation schématique des différentes étapes de la partie concernant le modèle PBPK.

Afin de réaliser un couplage du modèle PKSB avec un modèle PBPK, qui a pour but d'extrapoler les résultats obtenus à une population humaine, des simulations sur les concentrations intracellulaires rénales de CsA ont été réalisées en utilisant le logiciel Simcyp. Le logiciel a été

configuré comme indiqué dans la partie *3. Matériel et méthodes*. Cependant au niveau de la clairance de la CsA, deux choix se sont présentés : utiliser la clairance *in vivo* (définie dans Simcyp comme étant égale à 59,8 L/h), ou utiliser la clairance *in vitro* (définie dans Simcyp par un vmax égal à 200 pmol/min/pmol de CYP3A4 et un Km égal à 1.17 µmol/L). Dans le cadre d'une approche QIVIVE, il est intéressant d'utiliser le plus de données possibles provenant d'expérimentations *in vitro* ou d'approximations *in silico*, ou encore celles provenant des relations quantitatives structure à activité (QSAR). D'un autre côté, l'utilisation de la clairance *in vivo* permet, en toute logique, d'obtenir des résultats plus proches de ceux observés *in vivo*. Ainsi, les deux clairances ont été conservées et deux ensembles de simulations ont donc été réalisés en parallèle.

Les Figures 51 et 52 présentent les résultats obtenus en utilisant d'une part la clairance *in vivo* (Figure 51) et d'autre part la clairance *in vitro* (Figure 52).

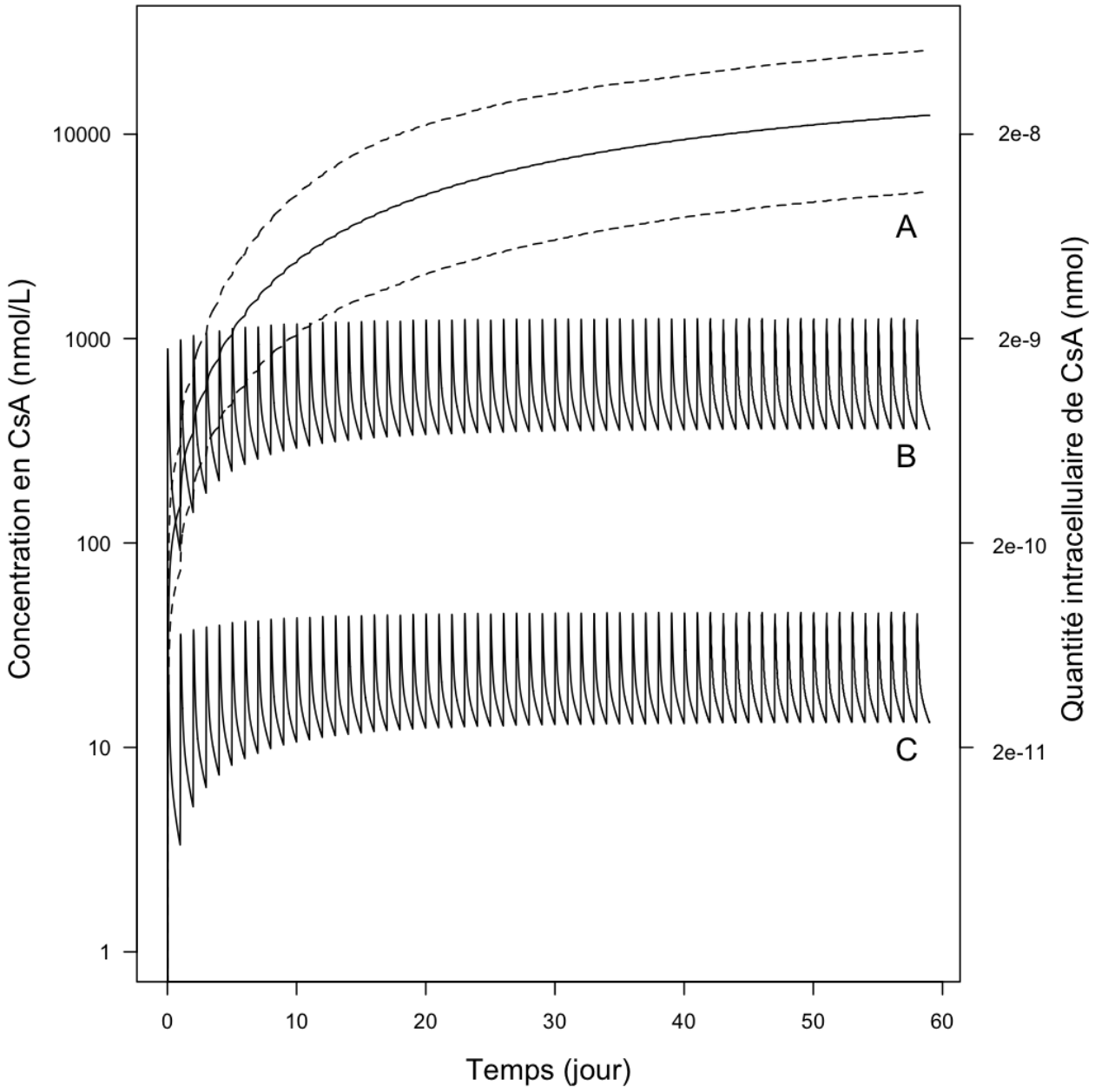


Figure 51 : Prédictions des concentrations en CsA dans le plasma (B) et dans le liquide extracellulaire rénale (C), et des concentrations et quantités de CsA dans les cellules rénales (A), pour 100 sujets, pour une administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, et en utilisant la valeur de la clairance *in vivo*. Les lignes pleines correspondent à la prédiction moyenne pour les 100 sujets et les lignes en pointillés correspondent au 5ème et 95ème centiles des prédictions (uniquement pour les concentrations/quantités intracellulaires rénales).

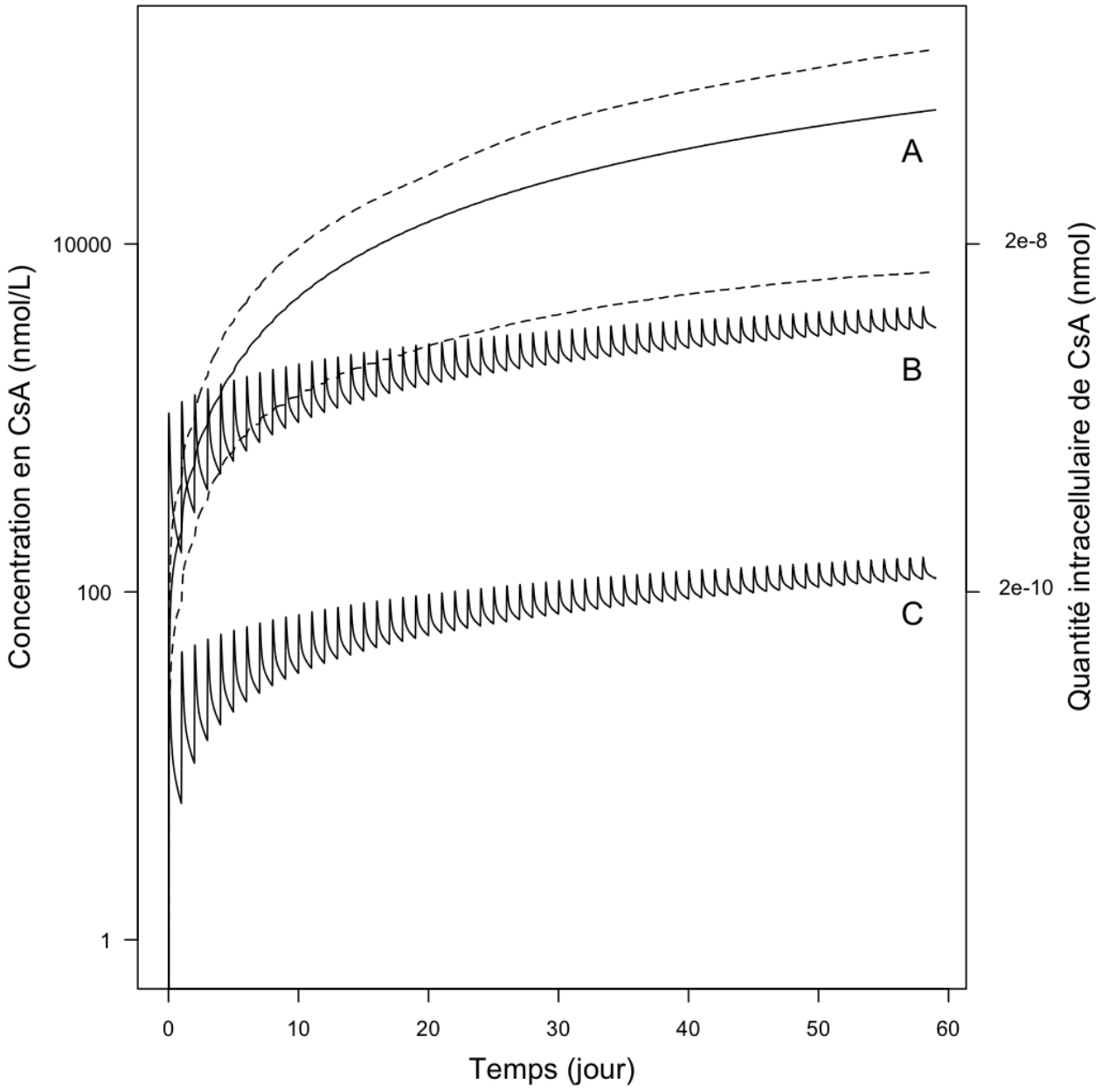


Figure 52 : Prédictions des concentrations en CsA dans le plasma (B) et dans le liquide extracellulaire rénale (C), et des concentrations et quantités de CsA dans les cellules rénales (A), pour 100 sujets, pour une administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, et en utilisant la valeur de la clairance *in vitro*. Les lignes pleines correspondent à la prédiction moyenne pour les 100 sujets et les lignes en pointillés correspondent au 5ème et 95ème centiles des prédictions (uniquement pour les concentrations/quantités intracellulaires rénales).

La différence, entre les résultats obtenus en utilisant la clairance *in vivo* ou la clairance *in vitro*, est nettement visible. En effet, en utilisant la clairance *in vivo* (Figure 51), les concentrations dans le plasma et dans le liquide extracellulaire rénal, atteignent un plateau au bout d'une quinzaine de jours. Alors qu'en utilisant la clairance *in vitro*, ces deux concentrations n'ont toujours pas atteint de plateau au bout des 60 jours. Cette première différence est importante à prendre en compte pour la suite, car lors du couplage avec un modèle permettant de modéliser des effets, les concentrations retrouvées dans la biophase vont être décisives dans la prédiction de ces effets. L'accumulation de la molécule étudiée dans le compartiment d'intérêt, par exemple, peut entrainer rapidement une instabilité du système.

La différence très nette observée ici, vient principalement de la structure du modèle utilisé par Simcyp. En effet, lorsque la clairance *in vitro* est choisie, il est possible d'ajouter plusieurs enzymes du métabolisme et de modifier les paramètres les concernant (vmax, Km, fu_{mic}, etc). Le fait que les concentrations dans le plasma et dans le liquide extracellulaire rénal ne soient pas stabilisées après 60 jours est donc probablement dû à une saturation d'un ou plusieurs mécanismes impliqué dans le métabolisme. A l'inverse, lorsque la clairance *in vivo* est choisie, il n'est pas possible d'ajouter dans Simcyp de mécanismes saturables. Ainsi dans ce cas, la valeur de la clairance sera certainement plus proche de la réalité, mais perdre la notion de saturation est un inconvénient important dans la modélisation pharmacocinétique. C'est d'autant plus important dans le cas de l'étude de population entière, et non d'un seul individu, car la variabilité concernant la composition et les quantités en enzymes du métabolisme peut être considérable.

Concernant les concentrations intracellulaires rénales, aucun plateau n'est observé au bout des 60 jours et ce, quel que ce soit le cas étudié (utilisation de la clairance prédite ou clairance *in vivo*). La présence d'un mécanisme de distribution saturable, et saturé dans le cas présent, est donc à envisager. On retrouve un facteur de 10 à 100 (selon la clairance utilisée) entre ces concentrations et celles simulées dans le plasma, et un facteur de 100 à 1000 entre ces concentrations et celles simulées dans l'eau extracellulaire. Ces résultats concordent avec ceux retrouvés dans la partie *4.1. PK* in vitro, puisqu'il en ressort aussi une affinité importante de la CsA pour le milieu intracellulaire.

4.4. Modèle « PBPK-SB » (couplage du modèle PBPK avec le modèle PKSB)

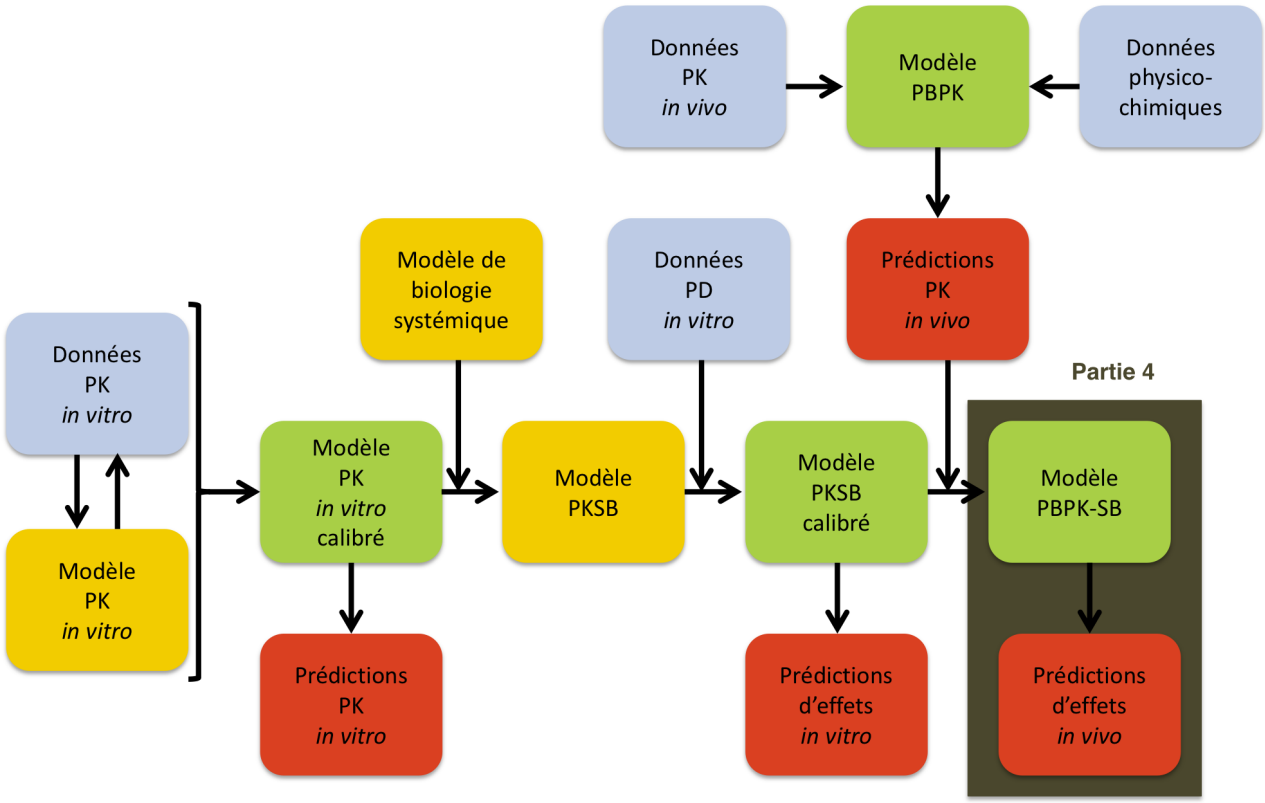


Figure 53 : Présentation schématique des différentes étapes de la partie concernant le couplage PBPK-SB (Partie 4).

Pour chacune des deux méthodes présentées précédemment (*cf.* Matériel et Méthodes), quatre ensembles de 100 sujets ont en réalité été conçus. L'utilisation de quatre ensembles différents provient du fait que les données intracellulaires rénales ont été simulées de deux façons différentes dans Simcyp (une en utilisant la clairance *in vivo*, et l'autre en utilisant la clairance *in vitro*), et de la présence de deux ensembles de solutions distincts mis en évidence dans le modèle PKSB.

La Figure 54 présente les prédictions des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant le PES, et en utilisant la valeur de la

clairance *in vivo*. La Figure 55 présente les mêmes résultats mais réalisés cette fois en utilisant la clairance *in vitro*.

Comme pour les résultats obtenus avec le modèle PKSB seul, on remarque sur la Figure 54 la présence de deux types de profils différents : un profil de type oscillant et un profil de type plateau. Les valeurs des quantités intracellulaires de CsA sont issues du modèle PBPK, ainsi il est logique de retrouver exactement les mêmes profils de courbes. À de telles quantités, la présence de CsA ne semble pas avoir d'influence sur le système car les quantités des ROS, de GSH, de γ-GC et de Nrf2 se stabilisent aux mêmes niveaux que lorsqu'aucune quantité CsA n'est administrée.

Les résultats obtenus en utilisant la valeur de la clairance *in vitro* (Figure 55) se rapprochent très fortement de ceux obtenus avec la clairance *in vivo* (Figure 54). Les quantités intracellulaires de CsA, supérieures à celles observées lorsque la clairance *in vivo* est utilisée, ne semblent toujours pas suffisantes pour avoir une influence sur le système et c'est ce qui explique la ressemblance aussi importante entre les deux Figures.

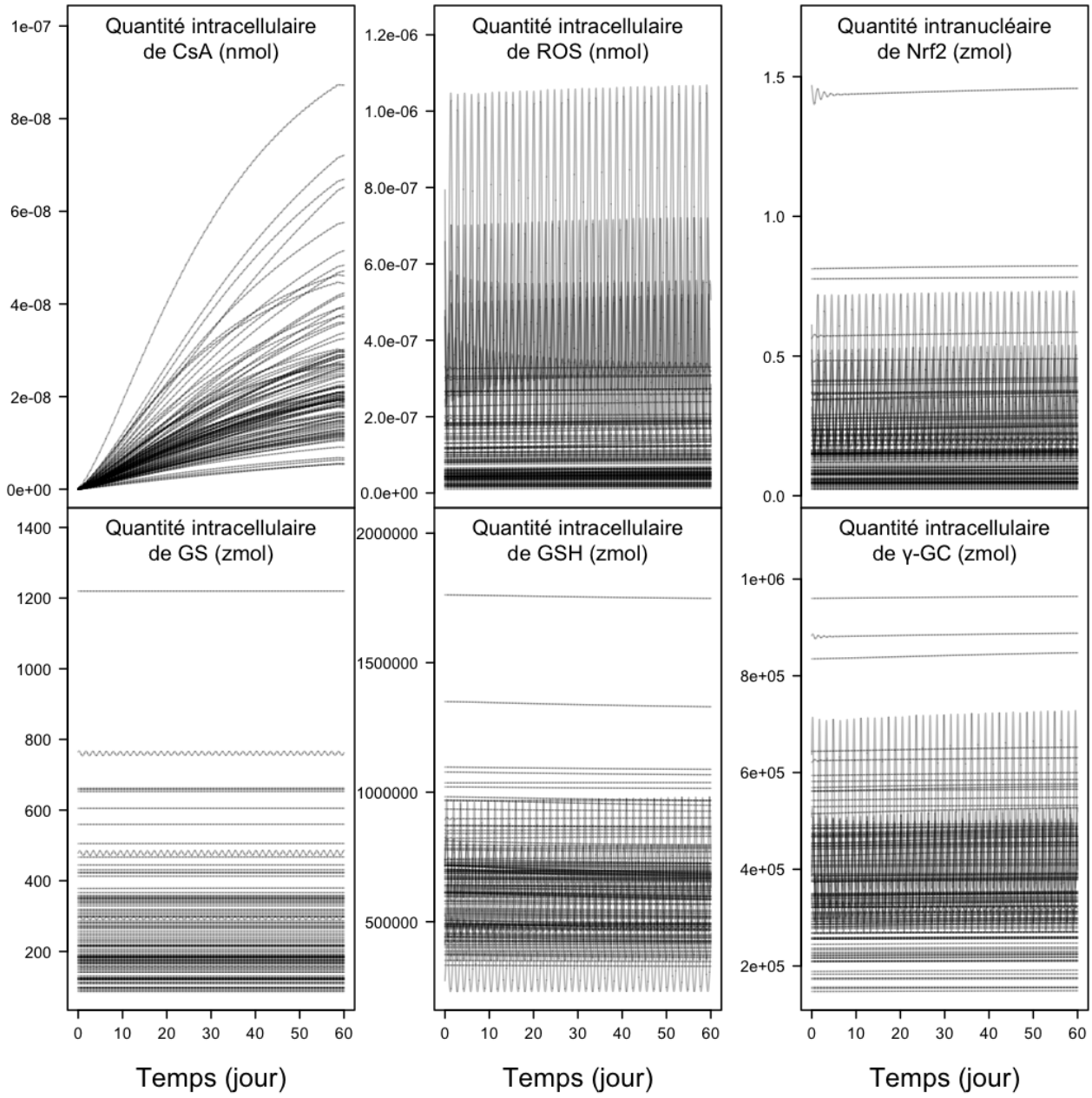


Figure 54 : Prédictions des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant la valeur de la clairance *in vivo*, et en utilisant le PES.

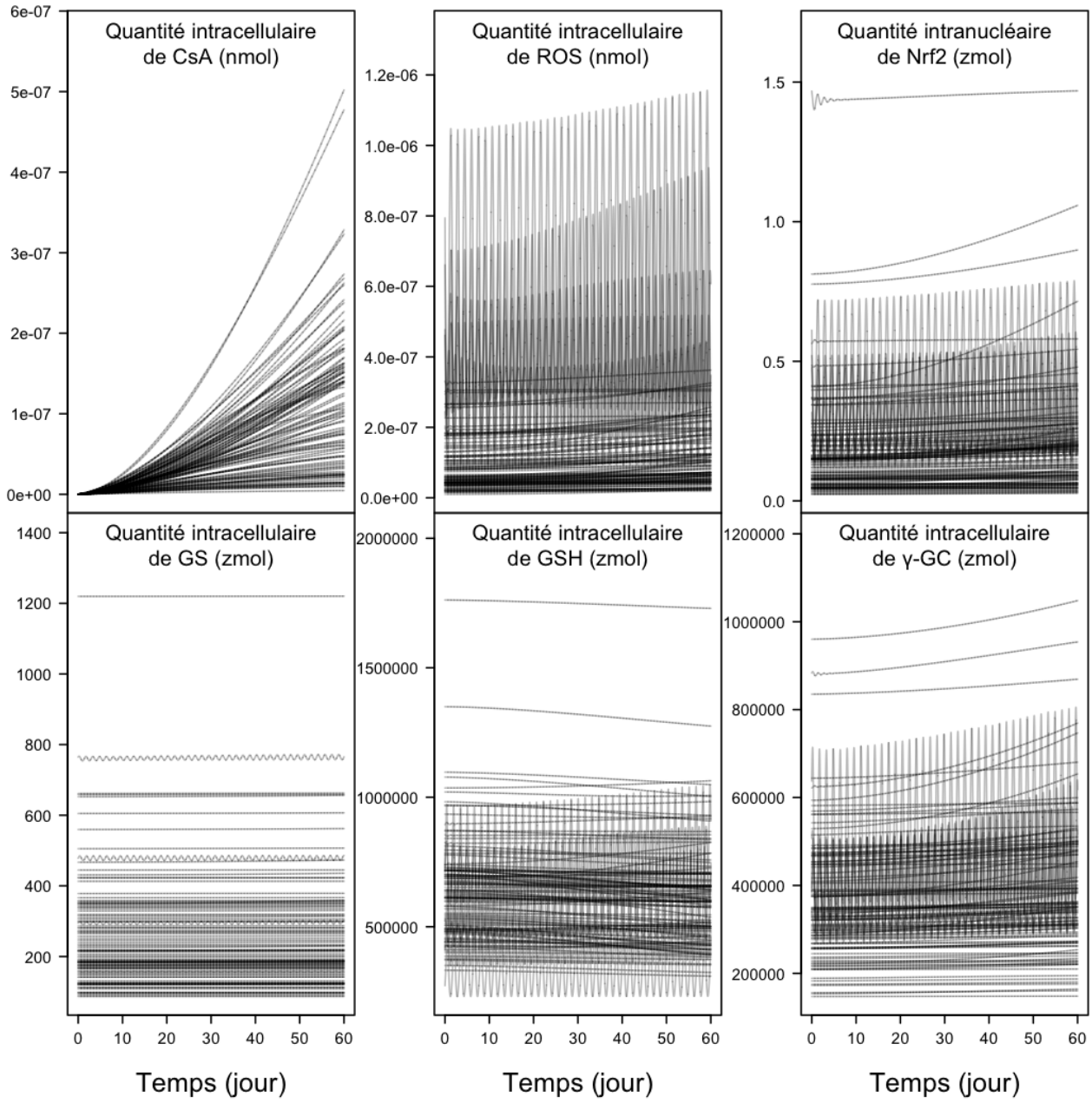


Figure 55 : Prédictions des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant la valeur de la clairance *in vitro*, et en utilisant le PES.

La Figure 56 présente les prédictions des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant le SES, et en utilisant la valeur de la clairance *in vivo*. La Figure 57 présente les mêmes résultats mais réalisés cette fois en utilisant la clairance *in vitro*.

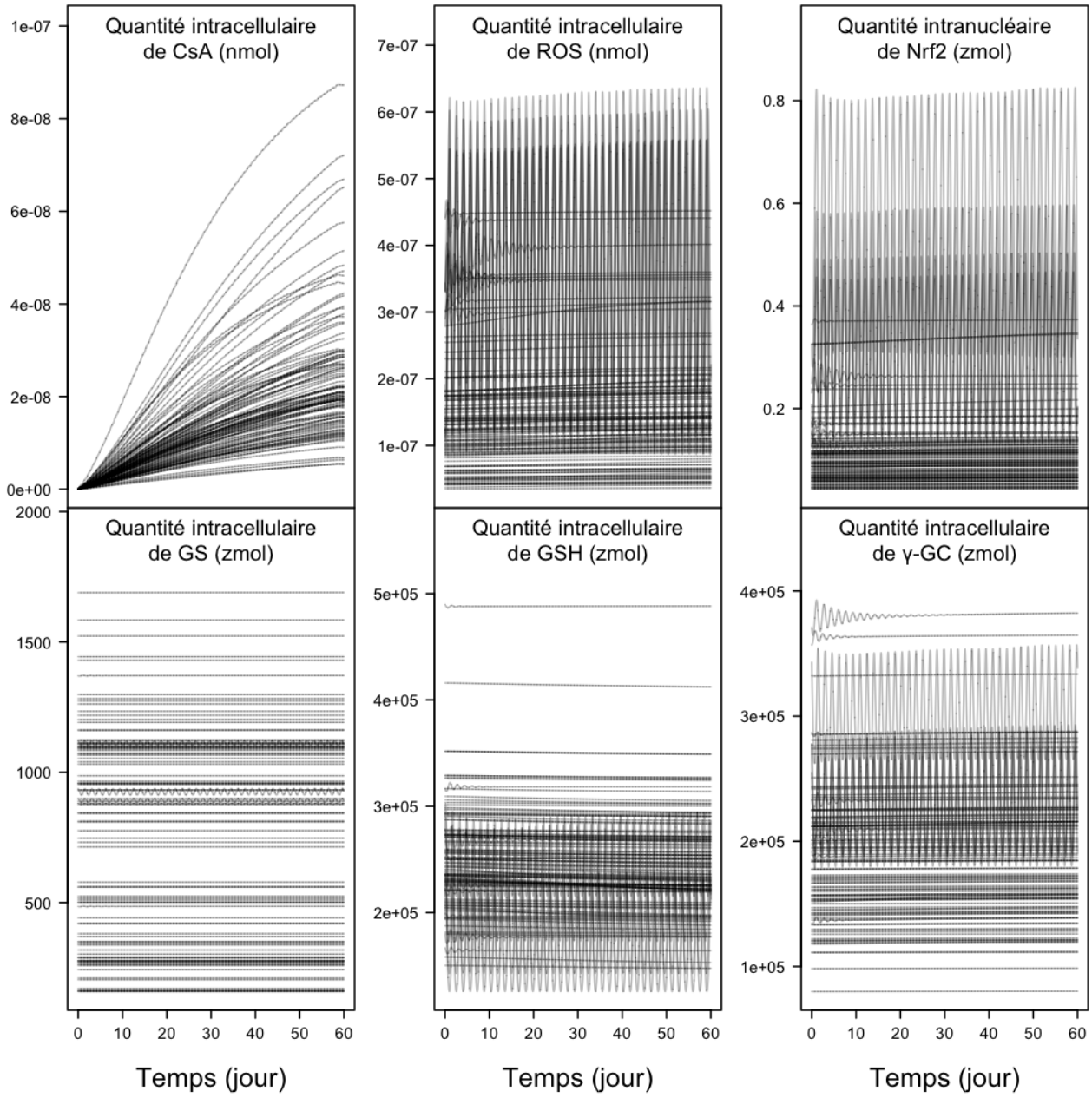


Figure 56 : Prédictions (échelles semi-logarithmiques) des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant la valeur de la clairance *in vivo*, et en utilisant le SES.

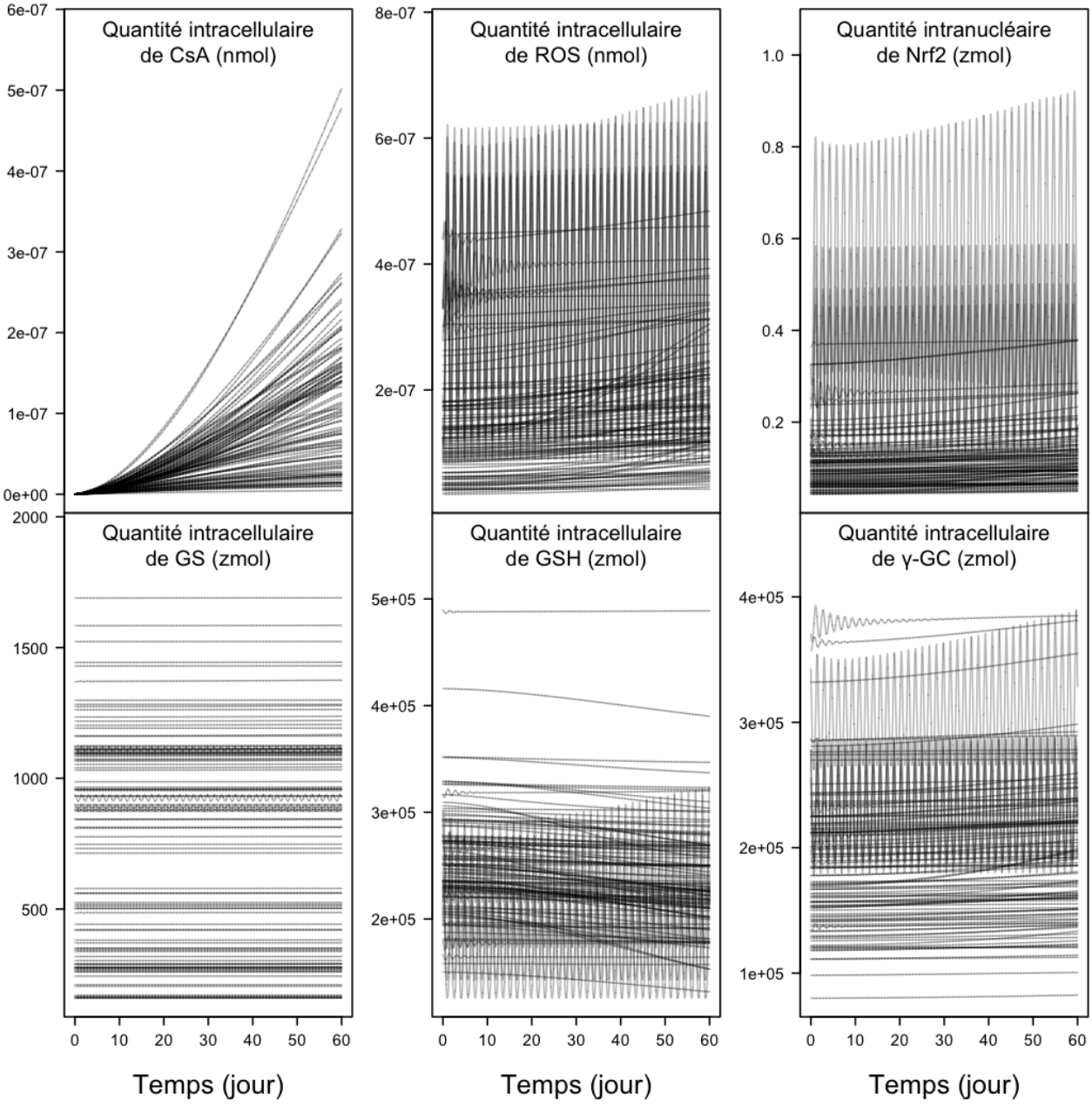


Figure 57 : Prédictions des quantités intracellulaires des ROS, de GSH, de GS, de γ-GC et intranucléaires de Nrf2 au cours du temps (sur 60 jours) pour 100 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA, en utilisant la valeur de la clairance *in vitro*, et en utilisant le PES.

On retrouve dans les Figures 56 et 57 les mêmes particularités que celles présentes dans les Figures illustrant les quantités des ROS, de Nrf2, de GSH et de γ-GC en fonction du temps et de la concentration en CsA administrée (Figures 45 à 49). Pour les quantités de Nrf2 et de GSH, les deux types de profils habituels sont présents (oscillant et plateau). Pour les quantités de GSH, les plateaux sont difficilement visibles car, comme dans la Figure 48, ils sont situés à un niveau plus bas que les maximums des oscillations. Pour les quantités de γ-GC, on retrouve, là aussi, le même phénomène que celui visible dans la Figure 49, c'est-à-dire la présence de droites pour quelques uns des sujets.

Afin d'étudier la variabilité inter-individuelle, des distributions des maximums de ces quantités sur un échantillon plus grand (10000 sujets) ont été réalisées et sont présentées dans les Figures 58 à 61. Les maximums sont déterminés au jour 60.

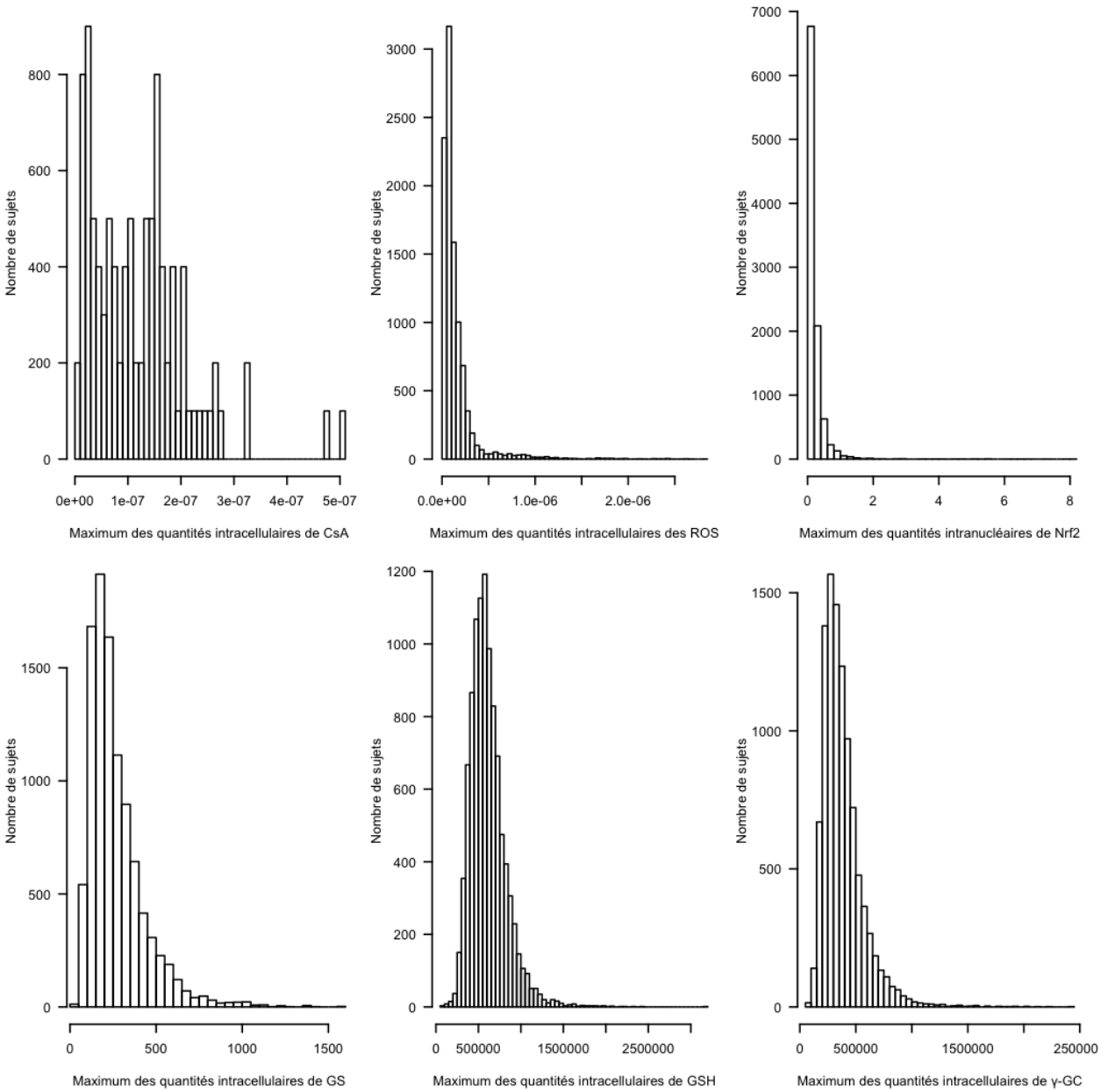


Figure 58 : Distributions des maximums des quantités intracellulaires de CsA (nmol), des ROS (nmol), de GS (zmol), de GSH (zmol), de γ-GC (zmol) et intranucléaires de Nrf2 (zmol) pour 10000 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA sur 60 jours, en utilisant la valeur de la clairance *in vitro*, et en utilisant le PES.

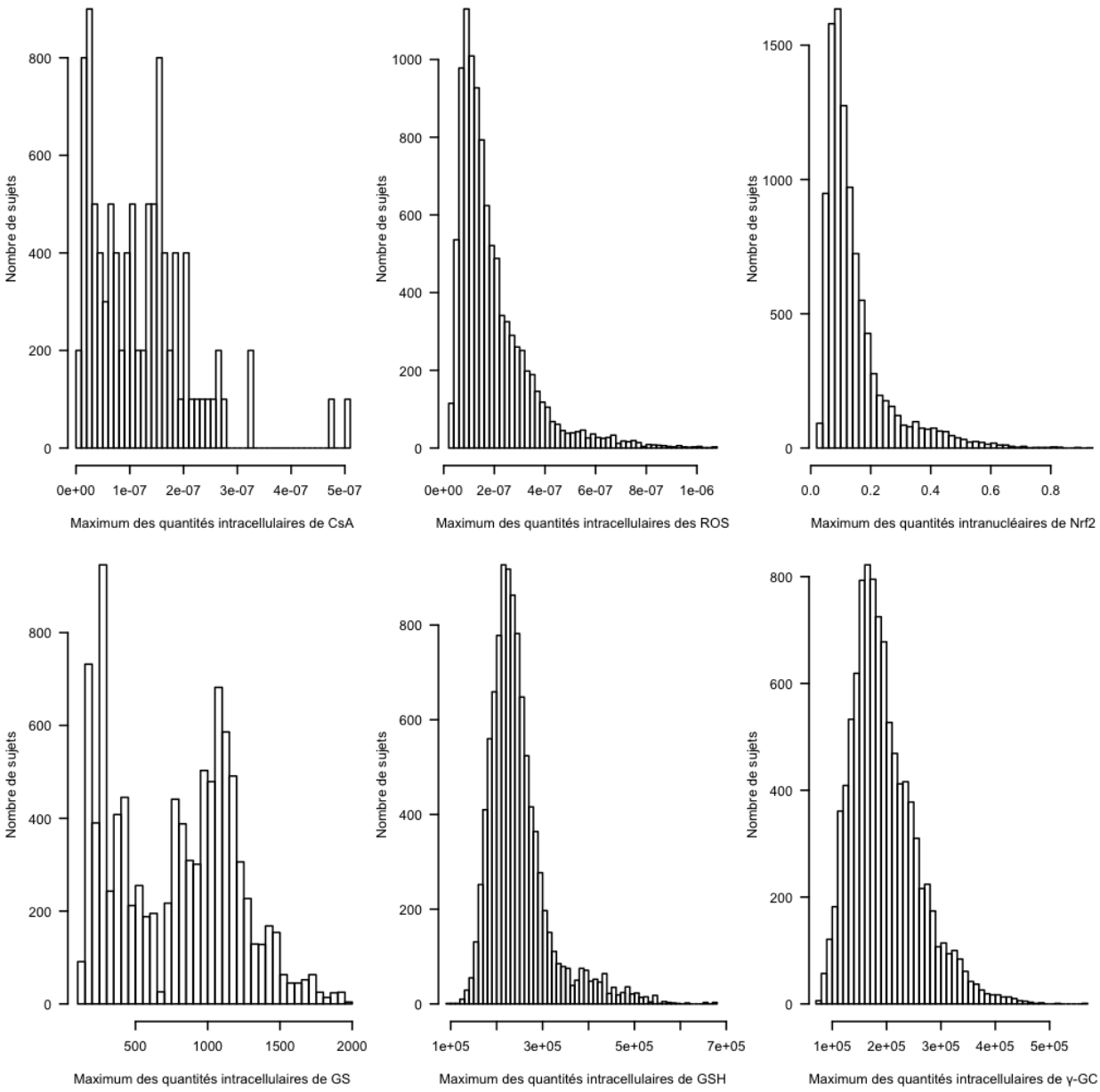


Figure 59 : Distributions des maximums des quantités intracellulaires de CsA (nmol), des ROS (nmol), de GS (zmol), de GSH (zmol), de γ-GC (zmol) et intranucléaires de Nrf2 (zmol) pour 10000 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA sur 60 jours, en utilisant la valeur de la clairance *in vitro*, et en utilisant le SES.

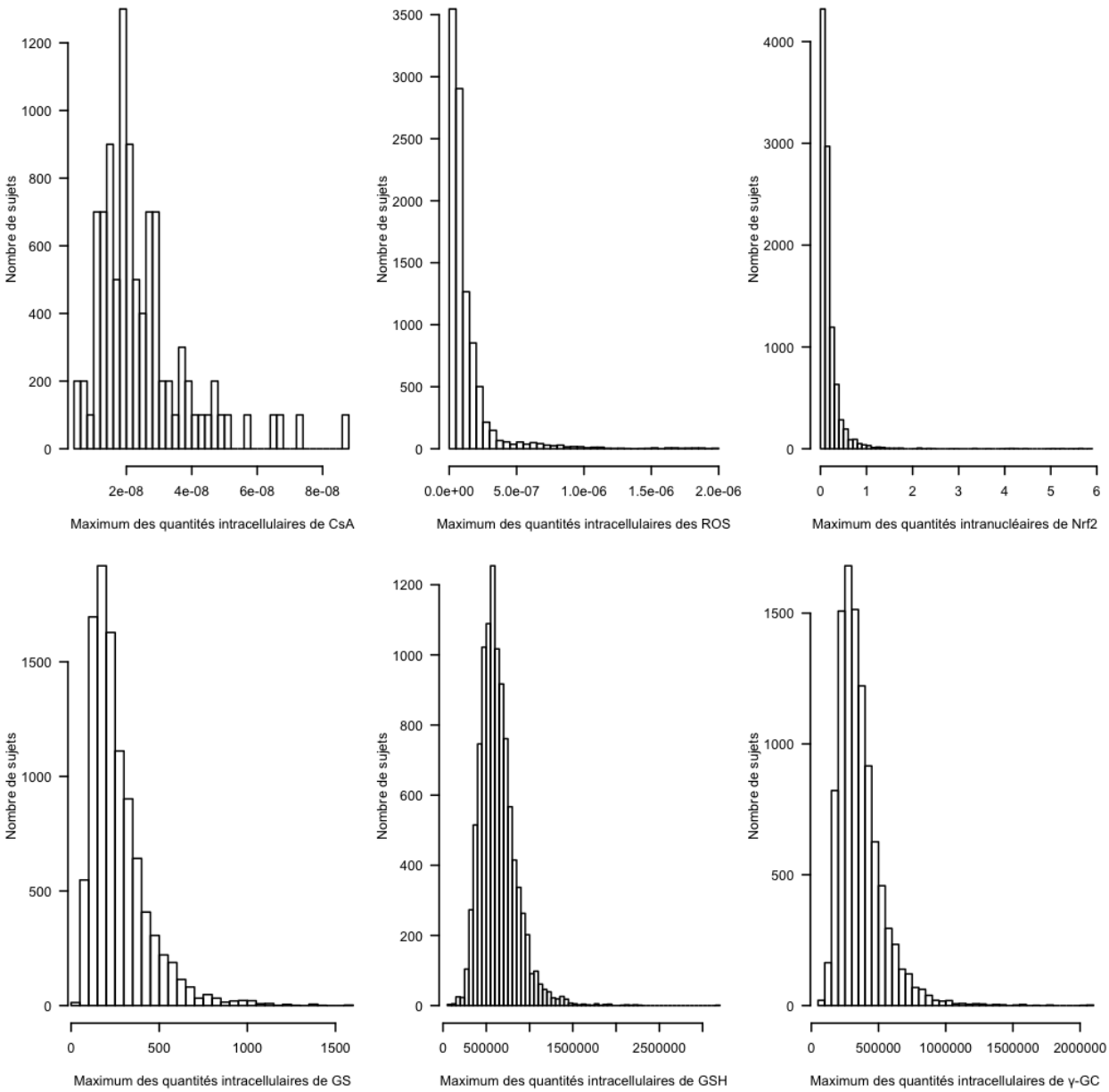


Figure 60 : Distributions des maximums des quantités intracellulaires de CsA (nmol), des ROS (nmol), de GS (zmol), de GSH (zmol), de γ-GC (zmol) et intranucléaires de Nrf2 (zmol) pour 10000 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA sur 60 jours, en utilisant la valeur de la clairance *in vivo*, et en utilisant le PES.

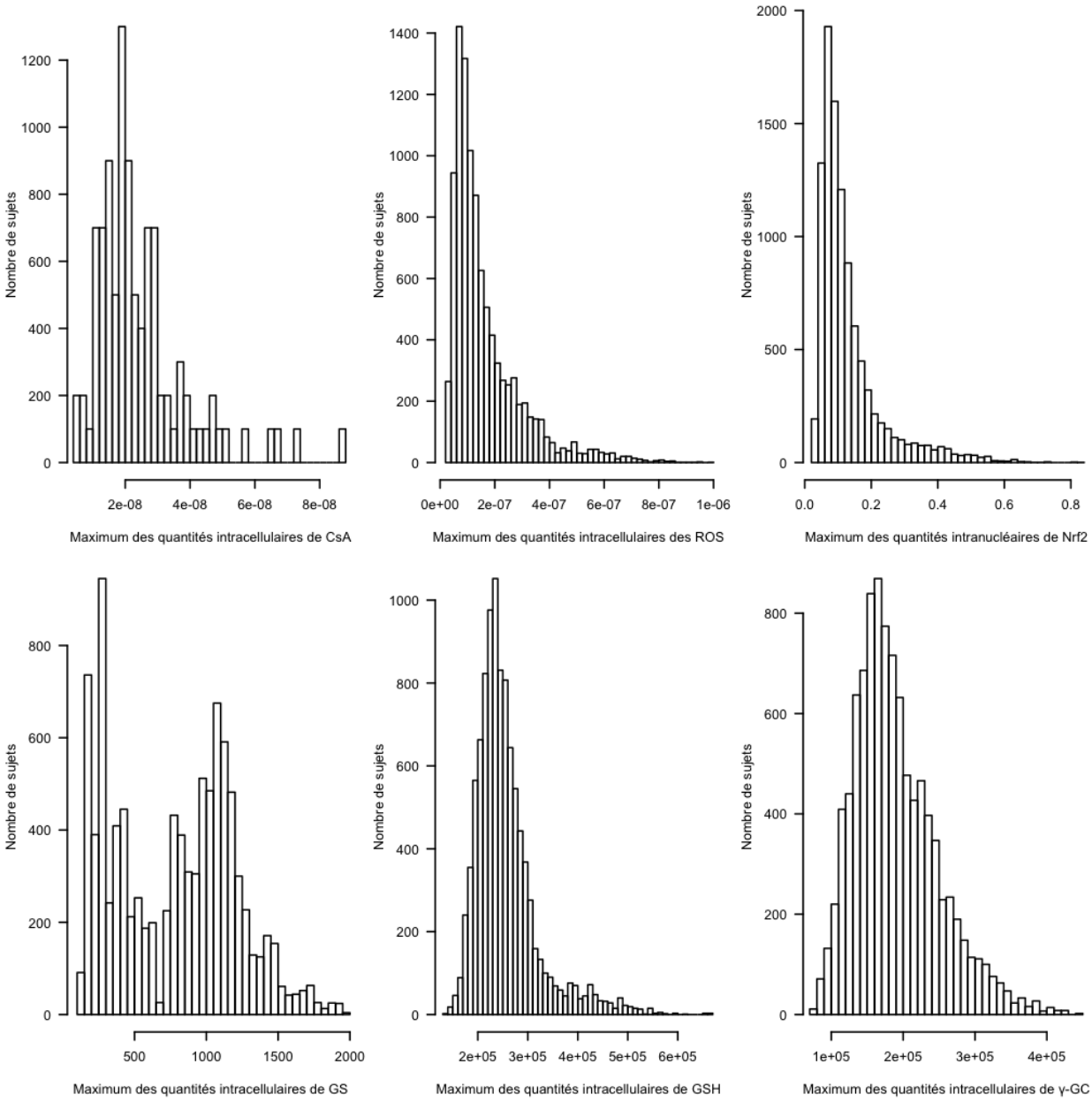


Figure 61 : Distributions des maximums des quantités intracellulaires de CsA (nmol), des ROS (nmol), de GS (zmol), de GSH (zmol), de γ-GC (zmol) et intranucléaires de Nrf2 (zmol) pour 10000 sujets après administration quotidienne de 10 mg/kg de CsA sur 60 jours, en utilisant la valeur de la clairance *in vivo*, et en utilisant le SES.

Dans l'ensemble, les profils des distributions sont assez proches d'une condition à l'autre (clairance *in vivo* vs i*n vitro* et PES vs SES). Cependant, la ressemblance entre ces derniers est plus importante quand l'ensemble de solutions utilisées est conservé. La majorité des distributions, et plus particulièrement celles des maximums des quantités intracellulaires de CsA, n'a pas de forme précise. La plupart semble suivre une loi dissymétrique, de type log-normal, sauf pour la GS et le

GSH. Les distributions des maximums des quantités intracellulaires des ROS semblent suivre une telle loi, sauf dans le cas où la clairance *in vitro* et le SES sont utilisés. Pour les quantités intracellulaires de GS, les distributions de leurs maximums possèdent deux profils bien distincts. Lorsque le PES est utilisé, elles semblent suivre une loi dissymétrique, alors qu'elles semblent suivre une loi bimodale dans le cas où le SES est utilisé (ce qui pourrait s'expliquer par la distribution du paramètre caractérisant la transcription de l'ARNm de GS (Figure 40) qui semble, elle-aussi, suivre une loi bimodale). Enfin, pour les quantités intracellulaires de GSH, deux types de profils apparaissent : l'un pouvant refléter une loi dissymétrique (dans le cas où le SES est utilisé) et l'autre une loi symétrique (dans le cas où le PES est utilisé).

Il est intéressant de remarquer que pour une même condition, aucune des distributions n'est identique à une autre. Certaines présentent de fortes similitudes, comme les distributions des maximums des quantités intranucléaires de Nrf2 et intracellulaires des ROS, mais elles ne sont jamais superposables. Ainsi, les quantités de chacune de ces six espèces semblent être régies par des mécanismes en partie différents.

5. Discussion

Dans ce travail, nous avons essayé de démontrer la faisabilité de l'intégration complète de données omiques obtenues *in vitro* dans un ensemble de modèles prédictifs de la distribution et de la toxicité (par la voie Nrf2) de la CsA. Cette intégration s'est avérée complexe et appelle plusieurs commentaires.

PK* in vitro *et QIVIVE

Le fait d'établir un modèle de distribution *in vitro* a permis tout d'abord de reconstruire les concentrations intracellulaires de CsA au cours du temps lors des tests de toxicité *in vitro*. Ceci est très important car d'une part, les estimations du modèle sont beaucoup plus stables et précises que les données brutes ; d'autre part, les quantités intracellulaires de CsA n'ont été mesurées qu'au premier et au dernier jours des expérimentations, alors que des données omiques de toxicité ont été obtenues aussi au 3ème jour. On aurait pu essayer de faire une moyenne entre le premier et le dernier jour pour estimer la quantité intracellulaire de CsA au troisième jour, mais il est bien plus cohérent et précis de le faire par interpolation sur la base du modèle PK *in vitro*. De plus ce modèle, par son caractère mécaniste et prédictif, permet des extrapolations à des temps ultérieurs et des doses différentes des doses expérimentales. C'est donc un socle nécessaire à l'extrapolation de l'*in vitro* à l'*in vivo*, comme nous l'avons expliqué dans notre article sur cette extrapolation (*cf.* Annexes). Utiliser la quantité (ou la concentration) intracellulaire est aussi très important pour fonder la prédiction, puisque la réponse toxique (quantifiée à l'aide des données omiques) est causée par cette quantité, plutôt que par la quantité extracellulaire. Ce pourrait être différent pour une molécule agissant sur un récepteur membranaire, ce qui n'est pas le cas de la CsA.

***PK* in vitro *et PK* in vivo**

La prédiction des effets *in vivo* ne peut pas simplement se fonder sur les concentrations cellulaires mesurées ou prédites *in vitro*. Il est nécessaire de recourir à des mesures *in vivo* ou bien (et nécessairement dans un cadre de toxicologie prédictive) à un modèle de type PBPK. On a bien vu ici que les concentrations cellulaires *in vitro* (Figures 13 et 14) et *in vivo* (Figures 51 et 52) peuvent avoir des profils temporels et des niveaux différents. Dans le premier cas, un plateau est rapidement atteint et la distribution de la CsA dans la cellule semble être à l'équilibre au bout de quelques jours ; dans le second, aucun plateau n'est atteint au bout de 60 jours. Un point est à

discuter cependant. Dans le modèle PK *in vitro*, l'équation modélisant la sortie de la CsA hors de la cellule est de type Michaelis-Menten et donc saturable. Dans le modèle de Simcyp, elle est linéaire. Le fait que la CsA s'accumule rapidement dans la cellule est dû à la présence d'une clairance d'entrée plus grande que celle de sortie, mais surtout à la présence d'une fraction libre intracellulaire très faible (révélateur d'une très forte affinité pour un ou des ligand(s) intracellulaire(s)). Tous les mécanismes impliqués dans la distribution intracellulaire rénale de la CsA sont linéaires. Ainsi contrairement au modèle PK *in vitro*, quelle que ce soit la concentration ou la quantité de CsA administrée, les prédictions *in vivo* présenteront toujours le même profil, et les concentrations intracellulaires en CsA seront toujours proportionnelles à celles extracellulaires. Cette question est importante, car, comme dit précédemment, les quantités intracellulaires de CsA sont une des variables les plus importantes du modèle, et pouvoir les prédire correctement est une étape indispensable. Afin de mieux comprendre les phénomènes de distribution intracellulaire de la CsA et d'affiner les équations utilisées dans le modèle PBPK, des données supplémentaires concernant cette quantité seraient donc utiles.

Les valeurs prises par les quantités intracellulaires de CsA sont, elles aussi, éloignées d'un modèle à l'autre. Cet élément était prévisible car les modes d'administration sont différents et les quantités administrées sont difficilement comparables. Pour le modèle PK *in vitro* (Figures 13 et 14), les prédictions concernant les quantités intracellulaires de CsA au jour 60 sont comprises entre 1.10-6 et 3.10-6 nmol pour la faible concentration et entre 1.10-6 et 2,5.10-5 nmol pour la forte concentration. Pour le modèle PBPK (Figures 51 et 52), les quantités intracellulaires de CsA au jour 60 sont comprises entre 5.10-9 et 5.10-7 nmol, soit nettement inférieures à celles retrouvées pour le modèle PK *in vitro*. Les quantités intracellulaires de CsA étant beaucoup plus faibles dans le modèle PBPK-SB, il est normal de ne pas observer les mêmes profils de courbes que ceux rencontrés dans le modèle PKSB, que ce soit pour la faible ou la forte concentration. Concernant les quantités des ROS, on ne remarque aucune perturbation de celles-ci au cours des 60 jours de traitement par la CsA. Cette observation est plutôt cohérente car les quantités intracellulaires des ROS sont étroitement liées à celles intracellulaires de CsA, et dans le cas présent, ces dernières sont trop faibles pour avoir un impact significatif sur les quantités des ROS. Les oscillations visibles pour certains sujets correspondent aux oscillations basales spécifiques de certains vecteurs de paramètres. Les quantités de Nrf2, GS, GSH et γ-GC ne se sont pas sujettes à s'emballer et ce, quelle que ce soit la quantité intracellulaire de CsA, ainsi il est normal qu'elles restent stables. Cependant, en comparant les valeurs auxquelles ces quantités se stabilisent avec les valeurs obtenues à dose zéro, on constate qu'elles sont très proches et que donc, comme pour les quantités des ROS, la CsA n'a,

ici, aucune influence. De même, les oscillations visibles pour certains sujets correspondent aux oscillations basales spécifiques de certains vecteurs de paramètres.

Calibration du modèle PKSB

La valeur de la plupart des paramètres du modèle PKSB est la même que celle utilisée par Zhang *et al.* [53]. Cependant, le modèle de Zhang n'étant pas destiné à être utilisé spécifiquement avec la CsA, il a été nécessaire d'actualiser la valeur de certains paramètres par ajustement statistique aux données CsA disponibles. Le choix des paramètres à estimer a été fait en fonction des résultats obtenus après une analyse de sensibilité réalisée sur tous les paramètres présents dans le modèle (résultats non présentés). Seuls les paramètres les plus sensibles pour l'ajustement aux données, et non de l'ensemble des 164 paramètres du modèle, ont été recalibrés.

Après estimation par MCMC des paramètres choisis, pour plusieurs d'entre eux, la valeur moyenne de la distribution *a posteriori* s'éloigne clairement de la valeur de Zhang *et al.*, choisie comme moyenne de la distribution *a priori*. Parmi ces paramètres, on retrouve la vitesse de formation de base des ROS et la vmax d'élimination des ROS dont les distributions *a posteriori* sont centrées sur des valeurs deux fois plus élevées qu'*a priori*. Cette différence s'explique principalement par la structure des équations régissant la formation et l'élimination des ROS, différente dans le modèle de Zhang. Les différences les plus importantes entre distribution *a priori* et distribution *a posteriori*, se retrouvent pour certains paramètres contrôlant l'induction des gènes, où la différence est encore plus marquée avec les paramètres issus du SES, et pour le paramètre contrôlant la transcription de l'ARNm codant pour Nrf2. Enfin, les données omiques utilisées pour calibrer les modèles ne sont probablement pas les plus adéquates. Le fait d'avoir dû utiliser des FC s'est révélé plutôt contraignant car l'utilisation de FC induit une perte importante d'informations.

Comportement du modèle PKSB calibré

La présence d'oscillations pour certaines solutions du modèle PKSB est intéressante. L'étude des prédictions à la dose zéro permet d'apporter des éléments de réponse pour expliquer cette différence notable entre les solutions. En effet, quand aucune molécule exogène n'est ajoutée au système (dose zéro), on observe des oscillations pour certaines solutions. Ces oscillations pourraient correspondre à la présence d'un cycle naturel d'autorégulation des ROS et cela nécessiterait des études complémentaires pour le confirmer. De telles oscillations naturelles se rencontrent pour plusieurs phénomènes biologiques [60,61]. En comparant les distributions *a posteriori* des

paramètres, on remarque que pour le SES, l'estimation de l'erreur sur les mesures des données omiques est légèrement inférieure dans le cas où il y a présence d'oscillations à dose zéro. La confirmation de la présence d'oscillations basales devrait permettre de réduire l'ensemble des solutions possibles et donc d'améliorer la justesse des prédictions du modèle. En attendant une telle confirmation, nous avons choisi de présenter l'ensemble des résultats.

Le fait de retrouver dans les résultats de modèle PKSB des quantités des ROS moins importantes lorsque le SES est utilisé, s'explique par les distributions *a posteriori* des paramètres du modèle. Au moins cinq paramètres semblent être impliqués dans cette diminution des quantités des ROS : le paramètre responsable de l'induction des ROS, celui responsable de la transcription de l'ARNm de la GS et ceux responsables des inductions des gènes codant pour la GCLC, la GCLM et la GPx. Les niveaux les plus bas des ROS sont donc obtenus, d'une part, par une diminution de sa formation (causée par la diminution de la valeur moyenne du paramètre d'induction des ROS), et d'autre part, par une augmentation de la synthèse de plusieurs enzymes impliquées dans l'élimination des ROS (causée par une augmentation de la valeur moyenne des autres paramètres cités précédemment).

Cette différence entre les niveaux des ROS est importante à prendre en compte car ces derniers sont caractéristiques de l'état de stress d'une cellule et donc de son état général. Pouvoir prédire la dose (appelée dose critique par la suite) pour laquelle la quantité des ROS ne sera plus sous contrôle apporte une information importante sur la toxicité d'une molécule. Le fait d'obtenir deux ensembles de solutions qui donnent des prédictions fortement différentes sur cette dose critique, ne peut que nous conforter dans l'idée qu'il serait indispensable d'avoir plus de données pour paramétrer correctement notre modèle. En l'état, il permet déjà de nous donner un ordre de grandeur de la dose critique, cependant, l'idéal serait bien entendu de réduire cette fourchette.

Dans l'absolu, le fait d'obtenir des résultats différents concernant la dose critique n'est pas particulièrement gênant. Comme beaucoup de modèle de biologie systémique, celui utilisé pour la partie PKSB ne se concentre que sur une unique voie de signalisation. Il ne prend pas en compte d'autres variables qui peuvent potentiellement jouer de façon directe ou indirecte sur la production des ROS, car cette dernière n'est pas régulée de manière stricte et exclusive par la voie Nrf2. La présence de ces nombreux phénomènes biologiques pourrait expliquer, par exemple, le fait que la survie cellulaire ne soit pas perturbée lors des expérimentations *in vitro*, alors que les prédictions laissent penser le contraire (explosion des ROS à forte concentration). Les RPTEC présentent peut-être une autre voie antioxydante qui serait active pour des concentrations élevées en CsA et qui

permettrait d'éliminer les ROS s'accumulant. Un dernier élément concerne l'organisation des cellules. Dans le modèle PKSB, les cellules sont considérées une par une, et indépendantes les unes des autres. Aucune interaction entre les cellules n'est prise en compte dans le modèle. Le fait qu'aux concentrations testées lors des expérimentations *in vitro*, la CsA n'ait pas eu d'influence sur la survie cellulaire, pourrait être expliqué par la présence d'un mécanisme impliquant la coopération cellulaire. Enfin, afin de valider le modèle PKSB, les données concernant la survie cellulaire ne sont probablement pas les plus intéressantes à utiliser. Le dosage des quantités des ROS pendant les expérimentations *in vitro* aurait probablement apporté plus d'informations, permis de donner plus de crédibilité et de poids au modèle et aurait permis de vérifier les hypothèses le concernant.

Le fait de tenir compte, « en temps réel », de l'état physiologique et biochimique des organes inclus dans un modèle est probablement l'une des améliorations les plus intéressantes, mais aussi l'une des plus délicates et complexes, à apporter à la construction d'un modèle. Par exemple, le foie est l'un des premiers organes exposés lors de l'administration d'un xénobiotique par voie orale et donc l'un des plus susceptibles d'être endommagés par l'action de molécules toxiques. Pour une molécule métabolisée au niveau hépatique, l'intégrité du foie sera déterminante dans sa capacité à éliminer la molécule en question. Il est donc judicieux d'ajouter, lorsque l'on caractérise la pharmacocinétique d'une molécule, une étude de toxicité afin de considérer les lésions tissulaires pouvant être directement liées à l'administration de la molécule étudiée. Enfin, il faudrait idéalement intégrer ces potentiels effets toxiques dans le modèle, les quantifier et les incorporer dans la structure même du modèle, afin que ces derniers rendent compte en direct de l'état de chaque organe et modifient en conséquence l'absorption, la distribution et l'élimination de la molécule étudiée. Les effets toxiques d'une molécule étant étroitement liés à sa pharmacocinétique, le fait de les prendre en compte pour actualiser cette dernière serait aussi un avantage pour l'étude des effets eux-mêmes. Cela permettrait une meilleure compréhension de ces derniers et pourrait expliquer, dans certains cas, la non-linéarité dose-réponse de certaines manifestations toxiques d'une molécule. Ainsi, quels que soient notre domaine d'intérêt (pharmacocinétique ou toxicologie) et le type de sortie nous intéressant (concentrations dans l'organisme ou toxicité), il est important de ne pas oublier que la pharmacocinétique et la toxicologie ont une très forte influence l'une sur l'autre et qu'il est difficile d'étudier correctement et dans sa totalité l'une de ces deux disciplines sans faire appel à l'autre.

Couplage final du modèle PBPK et du modèle Nrf2

Dans l'industrie pharmaceutique, il n'est pas rare que le retrait d'un médicament du marché soit dû à un effet indésirable non détecté en recherche et développement. De plus, cet effet indésirable ne concerne, en général, qu'une très faible proportion d'individus et il est donc difficile à anticiper. L'utilisation de modèles permettant de prédire ce genre de comportement isolé est donc en forte demande dans l'industrie pharmaceutique. Les résultats obtenus avec le couplage PBPK-BS ne permettent pas de refléter ce type d'utilisation. Les quantités intracellulaires de CsA générées grâce au modèle PBPK sont beaucoup plus faibles que celles retrouvées dans le modèle PK *in vitro*, et sont insuffisantes pour avoir un effet significatif sur la production des ROS. La néphrotoxicité de la CsA est reconnue. En effet, elle a été mise en évidence grâce à l'étude de l'insuffisance rénale chez les patients ayant été transplantés avec un autre organe que le rein [62]. Selon l'organe transplanté, un pourcentage, plus ou moins important mais non négligeable, de patients présente une insuffisance rénale chronique avérée. La majorité des lésions observées est liée à la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine [63].

En réalité, la néphrotoxicité de la CsA implique de multiples mécanismes cellulaires et moléculaires, et la modélisation de la voie Nrf2 à elle-seule n'est probablement pas suffisante pour bien quantifier les effets toxiques de la CsA. Le stress oxydant, bien entendu, mais d'autres mécanismes faisant intervenir l'endothéline I [64], le TGF-β [65 ,66], le système rénine-angiotensine [67] ou encore l'apoptose [68], sont responsables de la néphrotoxicité de la CsA. Plusieurs hypothèses pourraient donc expliquer le fait que le système ne réagisse pas aux concentrations thérapeutiques de CsA : les ROS, à eux-seuls, ne représentent pas le mécanisme le plus toxique, ou alors, et c'est probablement l'hypothèse la plus envisageable, le modèle Nrf2 utilisé présente quelques lacunes au niveau structurel ou au niveau de la calibration et nécessiterait plus de données, là encore, pour évaluer plus correctement le niveau des ROS.

Il est dommage que le modèle PBPK-SB ne réagisse pas aux quantités intracellulaires de CsA *in vivo* car les résultats qui en découlent sont plutôt homogènes et ne permettent pas de conclure concrètement sur la prédiction de la toxicité de la CsA. Des résultats plus hétérogènes auraient été plus intéressants car (potentiellement) plus représentatifs d'une population. En effet, des résultats variés et différents les uns des autres permettent de reproduire les divers effets qu'un médicament pourrait avoir sur une population hétérogène. Il est plus sûr, lors du développement d'un médicament ou même lors de l'étude toxicologique d'un xénobiotique, de pouvoir appréhender un maximum de profils différents, même si certains sont probablement très peu représentatifs, plutôt

que de ne pas être en mesure de prévoir l'apparition d'effets indésirables rares mais potentiellement graves.

6. Conclusions et Perspectives

L’industrie pharmaceutique procède généralement de façon réductionniste. En réalité, cette approche a été à l'origine de nombreux succès thérapeutiques, mais elle semble montrer maintenant ses limites dans le cas de pathologies "difficiles" et multifactorielles (diabète, cancers, maladies neurodégénératives). Après détermination ou identification d'une cible thérapeutique potentielle, un nombre très important de molécules est testé sur cette cible afin d'apprécier principalement leur affinité, puis les effet des molécules retenues sont testés dans des modèles *in vitro* et animaux. Les médicaments ne se trouvent dans le contexte du patient que lors des essais cliniques, c'est-à-dire très tardivement dans le développement d'un médicament, et c’est souvent à ce moment que des effets indésirables comme la toxicité ou le manque d’efficacité sont révélés. La biologie systémique peut permettre d'expliquer et surtout prédire ces effets toxiques, ou une potentielle non efficacité d'une molécule candidate. Tout comme la pharmacocinétique, elle va probablement être de plus en plus utilisée en recherche et développement. A partir des années 1970, la pharmacocinétique a commencé à devenir une étape importante dans le développement d'un médicament car il s'est avéré qu'une grande partie des raisons, pour lesquelles une molécule d’intérêt n'aboutissait pas à la production d'un médicament, n'était pas correctement expliquée au travers des disciplines connues et utilisées à l'époque. En effet, les problèmes liés à la toxicité, à un manque d'efficacité ou au marketing n'expliquaient pas à eux seuls toutes les causes d'arrêt du développement d'une molécule d’intérêt. Après s'être rendu compte que ces causes inexpliquées provenaient, entre autres, de problèmes liés à l'absorption, à la distribution ou à l'accumulation des molécules d'intérêt dans l'organisme, la pharmacocinétique est donc devenue une étape indispensable dans le développement d'un médicament [69,70,71]. Ainsi, en considérant le « contexte biologique » plus en amont dans le processus de développement d'un médicament, l'utilisation de la biologie systémique devient une alternative incontournable. Un exemple de l'application de la biologie systémique en recherche et développement est l'utilisation de médicaments très spécifiques, comme les anticancéreux. Beaucoup de médicament de cette classe thérapeutique ont une action très ciblée qui dépend d'une cascade de réactions mises en jeu dans la cellule. Chez certains patients, la réponse thérapeutique observée ne correspond pas à celle attendue et il est parfois difficile d'expliquer l'origine de l'échec thérapeutique. L'utilisation de la biologie systémique permettrait ici de mieux comprendre les voies de signalisations activées ou inhibées par un médicament spécifique, et en fonction des caractéristiques génétiques du patient, il serait envisageable de prédire quantitativement la réponse thérapeutique pour une dose de médicament donnée.

Le travail présenté dans cette thèse montre que l'utilisation de la biologie systémique n'est pas facile et manque encore de maturité. Au delà des différentes connaissances auxquelles elle fait appel mais qui sont accessibles à tout scientifique prenant le temps de s'y intéresser, on se rend compte que la quantité de données et de paramètres à gérer est considérable. Pour un modèle ne prenant en compte qu'une seule voie de signalisation, comme celui présenté ici par exemple, plusieurs mois ont été nécessaires pour sa calibration. Cette durée est en grande partie imputable aux temps de calculs nécessaires aux estimations des paramètres par MCMC, et au temps nécessaire à la récolte et aux traitements des données très diverses (données PK, omiques, physiologiques, cellulaires, *etc.*). Concernant les données utilisées pour la calibration des modèles, il est important que le protocole soit défini de manière commune, c'est-à-dire que l'ensemble des équipes les utilisant par la suite participe à son élaboration et ce, avant toute expérimentation. Cette étape est primordiale car ces données, et plus particulièrement les données omiques, ne sont pas toujours utilisées de la même façon par ceux qui les produisent et par ceux qui veulent les intégrer à des modèles.

Références bibliographiques

1. Kim HJ, Vaziri ND (2010) Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. Am J Physiol Renal Physiol 298: F662-671.

2. Micallef S, Brochot C, Bois F-Y (2005) L'analyse statistique bayésienne de données toxicocinétiques. Environnement, Risques & Santé Volume 4: 21-34.

3. Wilmes A, Limonciel A, Aschauer L, Moenks K, Bielow C, et al. (2012) Application of integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling for the delineation of mechanisms of drug induced cell stress. J Proteomics 79C: 180-194.

4. Gupta SK, Manfro RC, Tomlanovich SJ, Gambertoglio JG, Garovoy MR, et al. (1990) Effect of food on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy subjects following oral and intravenous administration. J Clin Pharmacol 30: 643-653.

5. Bois FY, Habka D, Brochot Cl (2010) An integrated modelling approach for in vitro to in vivo extrapolations. ALTEX 27: 103-108.

6. Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM (1996) Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. Kidney Int 50: 1089-1100.

7. Olbricht CJ, Steinker M, Auch-Schwelk W, Bossaller C, Haas J, et al. (1994) Effect of cyclosporin on kidney proteolytic enzymes in men and rats. Nephrol Dial Transplant 9: 22-26.

8. Jennings P, Koppelstaetter C, Aydin S, Abberger T, Wolf AM, et al. (2007) Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 293: F831-838.

9. Parra Cid T, Conejo Garcia JR, Carballo Alvarez F, de Arriba G (2003) Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A nephrotoxicity. Toxicology 189: 99-111.

10. Sung JH, Esch MB, Shuler ML (2010) Integration of in silico and in vitro platforms for pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling. Expert Opin Drug Metab Toxicol 6: 1063-1081.

11. Coecke S, Pelkonen O, Leite SB, Bernauer U, Bessems JG, et al. (2013) Toxicokinetics as a key to the integrated toxicity risk assessment based primarily on non-animal approaches. Toxicol In Vitro 27: 1570-1577.

12. Bissell MJ, Rizki A, Mian IS (2003) Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. Curr Opin Cell Biol 15: 753-762.

13. Hagios C, Lochter A, Bissell MJ (1998) Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353: 857-870.

14. Micallef S, Amzal B, Bach V, Chardon K, Tourneux P, et al. (2007) Sequential updating of a new dynamic pharmacokinetic model for caffeine in premature neonates. Clin Pharmacokinet 46: 59-74.

15. Haggard HW (1924) The absorption, distribution, and elimination of ethyl ether. I. The amount of ether absorbed in relation to the concentration inhaled and its fate in the body. Journal of Biological Chemistry 59: 737-751.

16. Teorell T (1937) Kinetics of distribution of substances administered to the body. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie 57: 205-240.

17. Gibaldi M, Perrier D (1982) Pharmacokinetics, Second Edition, revised and expanded ed., Marcel Dekker, New York.

18. Bischoff KB, Dedrick RL, Zaharko DS, Longstreth JA (1971) Methotrexate pharmacokinetics. Journal of Pharmaceutical Sciences 60: 1128-1133.

19. Dedrick RL, Forrester DD, Cannon JN, El Dareer SM, Mellett LB (1973) Pharmacokinetics of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (ARA-C) deamination in several species. Biochemical Pharmacology 22: 2405-2417.

20. Gerlowski LE, Jain RK (1983) Physiologically based pharmacokinetic modeling: principles and applications. Journal of Pharmaceutical Sciences 72: 1103-1127.

21. Lutz RJ, Dedrick RL, Tuey D, Sipes G, Anderson MW, et al. (1984) Comparison of the pharmacokinetics of several polychlorinated biphenyls in mouse, rat, dog, and monkey by means of a physiological pharmacokinetic model. Drug Metabolism and Disposition 12: 527-535.

22. Jones HM, Parrott N, Jorga K, Lave T (2006) A novel strategy for physiologically based predictions of human pharmacokinetics. Clin Pharmacokinet 45: 511-542.

23. Clewell RA, Clewell HJ (2008) Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 129-143.

24. Campbell JL, Jr., Clewell RA, Gentry PR, Andersen ME, Clewell HJ, 3rd (2012) Physiologically based pharmacokinetic/toxicokinetic modeling. Methods Mol Biol 929: 439-499.

25. Davies B, Morris T (1993) Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharmaceutical Research 10: 1093-1095.

26. Brown RP, Delp MD, Lindstedt ST, Rhomberg LR, Beliles RP (1997) Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. Toxicology and Industrial Health 14: 407-484.

27. Young JF, Branham WS, Sheenan DM, Baker ME, Wosilait WD, et al. (1997) Physiological "constants" for PBPK models for pregnancy. Journal of Toxicology and Environmental Health 52: 385-401.

28. Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, et al. (2011) Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Arch Toxicol 85: 367-485.

29. Yuh L, Beal S, Davidian M, Harrison F, Hester A, et al. (1994) Population pharmacokinetic/pharmacodynamic methodology and applications: a bibliography. Biometrics 50: 566-575.

30. Gelman A, Bois FY, Jiang J (1996) Physiological pharmacokinetic analysis using population modeling and informative prior distributions. Journal of the American Statistical Association 91: 1400-1412.

31. Carvunis AR, Gomez E, Thierry-Mieg N, Trilling L, Vidal M (2009) Biologie systémique Des concepts d'hier aux découvertes de demain [Systems biology: from yesterday's concepts to tomorrow's discoveries]. Med Sci (Paris) 25: 578-584.

32. Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK (2008) NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. Chem Res Toxicol 21: 9-27.

33. Robertson DG (2005) Metabonomics in toxicology: a review. Toxicol Sci 85: 809-822.

34. Clarke CJ, Haselden JN (2008) Metabolic profiling as a tool for understanding mechanisms of toxicity. Toxicol Pathol 36: 140-147.

35. Clayton TA, Lindon JC, Everett JR, Charuel C, Hanton G, et al. (2004) Hepatotoxin-induced hypercreatinaemia and hypercreatinuria: their relationship to one another, to liver damage and to weakened nutritional status. Arch Toxicol 78: 86-96.

36. Williams RE, Cottrell L, Jacobsen M, Bandara LR, Kelly MD, et al. (2003) 1H-Nuclear magnetic resonance pattern recognition studies with N-phenylanthranilic acid in the rat: time- and dose-related metabolic effects. Biomarkers 8: 472-490.

37. Coen M, Lenz EM, Nicholson JK, Wilson ID, Pognan F, et al. (2003) An integrated metabonomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. Chem Res Toxicol 16: 295-303.

38. Griffin JL, Walker LA, Shore RF, Nicholson JK (2001) Metabolic profiling of chronic cadmium exposure in the rat. Chem Res Toxicol 14: 1428-1434.

39. Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. Mol Cell 48: 158-167.

40. Alfadda AA, Sallam RM (2012) Reactive oxygen species in health and disease. J Biomed Biotechnol 2012: 936486.

41. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, et al. (2010) Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. Nucleic Acids Res 38: 5718-5734.

42. Gosmanova EO, Le NA (2011) Cardiovascular Complications in CKD Patients: Role of Oxidative Stress. Cardiol Res Pract 2011: 156326.

43. Del Vecchio L, Locatelli F, Carini M (2011) What we know about oxidative stress in patients with chronic kidney disease on dialysis--clinical effects, potential treatment, and prevention. Semin Dial 24: 56-64.

44. Kuchta A, Pacanis A, Kortas-Stempak B, Cwiklinska A, Zietkiewicz M, et al. (2011) Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. Kidney Blood Press Res 34: 12-19.

45. Boutten A, Goven D, Artaud-Macari E, Bonay M (2011) La voie Nrf2 en pathologie respiratoire. [Protective role of Nrf2 in the lungs against oxidative airway diseases]. Med Sci (Paris) 27: 966-972.

46. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK (2009) Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. Free Radic Biol Med 47: 1304-1309.

47. Villeneuve NF, Lau A, Zhang DD (2010) Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. Antioxid Redox Signal 13: 1699-1712.

48. Nguyen T, Huang HC, Pickett CB (2000) Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. J Biol Chem 275: 15466-15473.

49. Wilmes A, Crean D, Aydin S, Pfaller W, Jennings P, et al. (2011) Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. Toxicol In Vitro 25: 613-622.

50. Bois FY (2013) Bayesian inference. Methods Mol Biol 930: 597-636.

51. Gelman A, Rubin DB (1992) Inference from iterative simulation using multiple sequences (with discussion). Statistical Science 7: 457-511.

52. Wieser M, Stadler G, Jennings P, Streubel B, Pfaller W, et al. (2008) hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. Am J Physiol Renal Physiol 295: F1365-1375.

53. Zhang Q, Pi J, Woods CG, Andersen ME (2009) Phase I to II cross-induction of xenobiotic metabolizing enzymes: a feedforward control mechanism for potential hormetic responses. Toxicol Appl Pharmacol 237: 345-356.

54. Tedesco D, Haragsim L (2012) Cyclosporine: a review. J Transplant 2012: 230386.

55. Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, Hebert MF, Davis CL, et al. (2004) In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. Biochem Pharmacol 68: 1889-1902.

56. Kawai R, Lemaire M, Steimer JL, Bruelisauer A, Niederberger W, et al. (1994) Physiologically based pharmacokinetic study on a cyclosporin derivative, SDZ IMM 125. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics 22: 327-365.

57. Bois FY (2009) GNU MCSim: Bayesian statistical inference for SBML-coded systems biology models. Bioinformatics 25: 1453-1454.

58. R Core Team (R Foundation for Statistical Computing) (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing.

59. Anglicheau D, Pallet N, Rabant M, Marquet P, Cassinat B, et al. (2006) Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. Kidney Int 70: 1019-1025.

60. Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, Vollmers C, Pulivarthy S, et al. (2009) Harmonics of circadian gene transcription in mammals. PLoS Genet 5: e1000442.

61. Jolma IW, Ni XY, Rensing L, Ruoff P (2010) Harmonic oscillations in homeostatic controllers: Dynamics of the p53 regulatory system. Biophys J 98: 743-752.

62. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, et al. (2003) Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. N Engl J Med 349: 931-940.

63. Pillebout E, Nochy D, Hill G, Conti F, Antoine C, et al. (2005) Renal histopathological lesions after orthotopic liver transplantation (OLT). Am J Transplant 5: 1120-1129.

64. Cauduro RL, Costa C, Lhulier F, Garcia RG, Cabral RD, et al. (2005) Endothelin-1 plasma levels and hypertension in cyclosporine-treated renal transplant patients. Clin Transplant 19: 470-474.

65. Campistol JM, Inigo P, Jimenez W, Lario S, Clesca PH, et al. (1999) Losartan decreases plasma levels of TGF-beta1 in transplant patients with chronic allograft nephropathy. Kidney Int 56: 714-719.

66. Ozdemir BH, Ozdemir FN, Demirhan B, Haberal M (2005) TGF-beta1 expression in renal allograft rejection and cyclosporine A toxicity. Transplantation 80: 1681-1685.

67. Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TF, et al. (1995) Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. J Am Soc Nephrol 6: 1186-1196.

68. Justo P, Lorz C, Sanz A, Egido J, Ortiz A (2003) Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. J Am Soc Nephrol 14: 3072-3080.

69. Rowland M, Noe CR, Smith DA, Tucker GT, Crommelin DJ, et al. (2012) Impact of the pharmaceutical sciences on health care: a reflection over the past 50 years. J Pharm Sci 101: 4075-4099.

70. Rowland M, Peck C, Tucker G (2011) Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. Annu Rev Pharmacol Toxicol 51: 45-73.

71. Jang GR, Harris RZ, Lau DT (2001) Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery research. Med Res Rev 21: 382-396.

72. Maher JM, Dieter MZ, Aleksunes LM, Slitt AL, Guo G, et al. (2007) Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. Hepatology 46: 1597-1610.

Annexes

Liste des équations différentielles du modèle PBSK :

$$\frac{\partial AhR_{cytosol}}{\partial t} = -k_{b_2}.CsA_{cytosol}.AhR_{cytosol}+k_{u_2}.CsA_AhR_{cytosol} \quad \text{(A1)}$$

$$\frac{\partial AhR_{nucleus}}{\partial t} = -k_{b_5}.CsA_{nucleus}.AhR_{nucleus}+k_{u_5}.CsA_AhR_{nucleus} \quad \text{(A2)}$$

$$\frac{\partial ARE_{GCLC}}{\partial t} = -k_{b_{40}}.ARE_{GCLC}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{40}}+k_{u_{40}}.NMA_{GCLC} \quad \text{(A3)}$$

$$\frac{\partial ARE_{GCLM}}{\partial t} = -k_{b_{46}}.ARE_{GCLM}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{46}}+k_{u_{46}}.NMA_{GCLM} \quad \text{(A4)}$$

$$\frac{\partial ARE_{GS}}{\partial t} = -k_{b_{32}}.ARE_{GS}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{32}}+k_{u_{32}}.NMA_{GS} \quad \text{(A5)}$$

$$\frac{\partial ARE_{GPx}}{\partial t} \quad -k_{b_{54}}.ARE_{GPx}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{54}}+k_{u_{54}}.NMA_{GPx} \quad \text{(A6)}$$

$$\frac{\partial ARE_{MRP}}{\partial t} = -k_{b_{63}}.ARE_{MRP}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{63}}+k_{u_{63}}.NMA_{MRP} \quad \text{(A7)}$$

$$\frac{\partial ARE_{Nrf2}}{\partial t} = -k_{b_{25}}.ARE_{Nrf2}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{25}}+k_{u_{25}}.NMA_{Nrf2} \quad \text{(A8)}$$

$$\frac{\partial ARNT_{nucleus}}{\partial t} = -k_{b_6}.CsA_AhR_{nucleus}.ARNT_{nucleus}+k_{u_6}.XAA_{nucleus} \quad \text{(A9)}$$

$$\frac{\partial CsA_{cytosol}}{\partial t} = CL_{in_1}.\frac{CsA_{extracellular}}{V_{extracellular}} - \frac{\frac{CL_{out_1}}{Km_{out_1}}.\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}}}{1+\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}.Km_{out_1}}} - \frac{v_{max_7}.CYP_{cytosol}.CsA_{cytosol}}{Km_2+CsA_{cytosol}} - k_{b_2}.CsA_{cytosol}.AhR_{cytosol}+k_{u_2}.CsA_AhR_{cytosol} - CL_{in_4}.\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}}+CL_{out_4}.\frac{CsA_{nucleus}}{V_{nucleus}} \quad (A10)$$

$$\frac{\partial CsA_{extracellular}}{\partial t} = -CL_{in_1}.\frac{CsA_{extracellular}}{V_{extracellular}}+\frac{\frac{CL_{out_1}}{Km_{out_1}}.\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}}}{1+\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}.Km_{out_1}}} - k_1.CsA_{extracellular}+k_2\left(CsA_{wall}\right)^{k_3} \quad (A11)$$

$$\frac{\partial CsA_{nucleus}}{\partial t} = -k_{b_5}.CsA_{nucleus}.AhR_{nucleus}+k_{u_5}.CsA_AhR_{nucleus} + CL_{in_4}.\frac{CsA_{cytosol}}{V_{cytosol}}-CL_{out_4}.\frac{CsA_{nucleus}}{V_{nucleus}} \quad (A12)$$

$$\frac{\partial CsA_{wall}}{\partial t} = k_1.CsA_{extracellular}-k_2\left(CsA_{wall}\right)^{k_3} \quad (A13)$$

$$\frac{\partial CsA_AhR_{cytosol}}{\partial t} = k_{b_2}.CsA_{cytosol}.AhR_{cytosol}-k_{u_2}.CsA_AhR_{cytosol} - CL_{in_3}.\frac{CsA_AhR_{cytosol}}{V_{cytosol}}+CL_{out_3}.\frac{CsA_AhR_{nucleus}}{V_{nucleus}} \quad (A14)$$

$$\frac{\partial CsA_AhR_{nucleus}}{\partial t} = CL_{in_3}.\frac{CsA_AhR_{cytosol}}{V_{cytosol}}-CL_{out_3}.\frac{CsA_AhR_{nucleus}}{V_{nucleus}} + k_{b_5}.CsA_{nucleus}.AhR_{nucleus}-k_{u_5}.CsA_AhR_{nucleus} - k_{b_6}.CsA_AhR_{nucleus}.ARNT_{nucleus}+k_{u_6}.XAA_{nucleus} \quad (A15)$$

$$\frac{\partial CYP_{cytosol}}{\partial t} = -k_{deg_{24}}.CYP_{cytosol}+k_{TSL_{23}}.mRNA_{CYP} \quad (A16)$$

$$\frac{\partial DRE_{CYP}}{\partial t} = -k_{b_{19}}.DRE_{CYP}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{19}} + k_{u_{19}}.XAAD_{CYP} \quad \text{(A17)}$$

$$\frac{\partial DRE_{GPx}}{\partial t} = -k_{b_{55}}.DRE_{GPx}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{55}} + k_{u_{55}}.XAAD_{GPx} \quad \text{(A18)}$$

$$\frac{\partial DRE_{MRP}}{\partial t} = -k_{b_{64}}.DRE_{MRP}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{64}} + k_{u_{64}}.XAAD_{MRP} \quad \text{(A19)}$$

$$\frac{\partial DRE_{Nrf2}}{\partial t} = -k_{b_{26}}.DRE_{Nrf2}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{26}} + k_{u_{26}}.XAAD_{Nrf2} \quad \text{(A20)}$$

$$\frac{\partial GCL_{cytosol}}{\partial t} = k_{b_{52}}.GCLC_{cytosol}.GCLM_{cytosol} - k_{u_{52}}.GCL_{cytosol} - k_{deg_{53}}.GCL_{cytosol} \quad \text{(A21)}$$

$$\frac{\partial GCLC_{cytosol}}{\partial t} = -k_{b_{52}}.GCLC_{cytosol}.GCLM_{cytosol} + k_{u_{52}}.GCL_{cytosol} - k_{deg_{45}}.GCLC_{cytosol} + k_{TSL_{44}}.mRNA_{GCLC} \quad \text{(A22)}$$

$$\frac{\partial GCLM_{cytosol}}{\partial t} = -k_{b_{52}}.GCLC_{cytosol}.GCLM_{cytosol} + k_{u_{52}}.GCL_{cytosol} - k_{deg_{51}}.GCLM_{cytosol} + k_{TSL_{50}}.mRNA_{GCLM} \quad \text{(A23)}$$

$$\frac{\partial Gene_{CYP_{OFF}}}{\partial t} = -k_{act_{20}}.Gene_{CYP_{OFF}} - k_{ind_{20}}.Gene_{CYP_{OFF}}.XAAD_{CYP} + k_{desact_{20}}.Gene_{CYP_{ON}} \quad \text{(A24)}$$

$$\frac{\partial Gene_{CYP_{ON}}}{\partial t} = k_{act_{20}}.Gene_{CYP_{OFF}} + k_{ind_{20}}.Gene_{CYP_{OFF}}.XAAD_{CYP} - k_{desact_{20}}.Gene_{CYP_{ON}} \quad \text{(A25)}$$

$$\frac{\partial Gene_{GCLC_{OFF}}}{\partial t} = -k_{act_{41}}.Gene_{GCLC_{OFF}} - k_{ind_{41}}.Gene_{GCLC_{OFF}}.NMA_{GCLC} + k_{desact_{41}}.Gene_{GCCL_{ON}} \quad \text{(A26)}$$

$$\frac{Gene_{GCLC_{ON}}}{\partial t} = k_{act_{41}}.Gene_{GCLC_{OFF}} + k_{ind_{41}}.Gene_{GCLC_{OFF}}.NMA_{GCLC} - k_{desact_{41}}.Gene_{GCLC_{ON}} \quad \text{(A27)}$$

$$\frac{\partial Gene_{GCLM_{OFF}}}{\partial t} = -k_{act_{47}}.Gene_{GCLM_{OFF}} - k_{ind_{47}}.Gene_{GCLM_{OFF}}.NMA_{GCLM} + k_{desact_{47}}.Gene_{GCLC_{ON}} \quad \text{(A28)}$$

$$\frac{\partial Gene_{GCLM_{ON}}}{\partial t} = k_{act_{47}}.Gene_{GCLM_{OFF}} + k_{ind_{47}}.Gene_{GCLM_{OFF}}.NMA_{GCLM} - k_{desact_{47}}.Gene_{GCLM_{ON}} \quad \text{(A29)}$$

$$\frac{\partial Gene_{GS_{OFF}}}{\partial t} = -k_{act_{33}}.Gene_{GS_{OFF}} - k_{ind_{33}}.Gene_{GS_{OFF}}.NMA_{GS} + k_{desact_{33}}.Gene_{GS_{ON}} \quad \text{(A30)}$$

$$\frac{\partial Gene_{GS_{ON}}}{\partial t} = k_{act_{33}}.Gene_{GS_{OFF}} + k_{ind_{33}}.Gene_{GS_{OFF}}.NMA_{GS} - k_{desact_{33}}.Gene_{GS_{ON}} \quad \text{(A31)}$$

$$\frac{Gene_{GPx_{OFF}}}{\partial t} = -k_{act_{56}}.Gene_{GPx_{OFF}} - k_{ind(NMA)_{56}}.Gene_{GPx_{OFF}}.NMA_{GPx} - k_{ind(XAAD)_{56}}.Gene_{GPx_{OFF}}.XAAD_{GPx} + k_{desact_{56}}.Gene_{GPx_{ON}} \quad \text{(A32)}$$

$$\frac{Gene_{GPx_{ON}}}{\partial t} = k_{act_{56}}.Gene_{GPx_{OFF}} + k_{ind(NMA)_{56}}.Gene_{GPx_{OFF}}.NMA_{GPx} k_{ind(XAAD)_{56}}.Gene_{GPx_{OFF}}.XAAD_{GPx} - k_{desact_{56}}.Gene_{GPx_{ON}} \quad \text{(A33)}$$

$$\frac{\partial Gene_{MRP_{OFF}}}{\partial t} = -k_{act_{65}}.Gene_{MRP_{OFF}} - k_{ind(NMA)_{65}}.Gene_{MRP_{OFF}}.NMA_{MRP} - k_{ind(XAAD)_{65}}.Gene_{MRP_{OFF}}.XAAD_{MRP} + k_{desact_{65}}.Gene_{MRP_{ON}} \quad \text{(A34)}$$

$$\frac{\partial Gene_{MRP_{ON}}}{\partial t} = k_{act_{65}}.Gene_{MRP_{OFF}} + k_{ind(NMA)_{65}}.Gene_{MRP_{OFF}}.NMA_{MRP} + k_{ind(XAAD)_{65}}.Gene_{MRP_{OFF}}.XAAD_{MRP} - k_{desact_{65}}.Gene_{MRP_{ON}} \quad \text{(A35)}$$

$$\frac{\partial Gene_{Nrf2_{OFF}}}{\partial t} = -k_{act_{27}}.Gene_{Nrf2_{OFF}} - k_{ind(NMA)_{27}}.Gene_{Nrf2_{OFF}}.NMA_{Nrf2} - k_{ind(XAAD)_{27}}.Gene_{Nrf2_{OFF}}.XAAD_{Nrf2} + k_{desact_{27}}.Gene_{Nrf2_{ON}} \quad \text{(A36)}$$

$$\frac{\partial Gene_{Nrf2_{ON}}}{\partial t} = k_{act_{27}}.Gene_{Nrf2_{OFF}} + k_{ind(NMA)_{27}}.Gene_{Nrf2_{OFF}}.NMA_{Nrf2} + k_{ind(XAAD)_{27}}.Gene_{Nrf2_{OFF}}.XAAD_{Nrf2} - k_{desact_{27}}.Gene_{Nrf2_{ON}} \quad \text{(A37)}$$

$$\frac{\partial GS_{cytosol}}{\partial t} = k_{b_{38}}.GS\,mono_{cytosol}.GS\,mono_{cytosol} - k_{u_{38}}.GS_{cytosol} - k_{deg_{39}}.GS_{cytosol} \quad \text{(A38)}$$

$$\frac{\partial GS\,mono_{cytosol}}{\partial t} = -2.k_{b_{38}}.GS\,mono_{cytosol}.GS\,mono_{cytosol} + 2.k_{u_{38}}.GS_{cytosol} - k_{deg_{37}}.GS\,mono_{cytosol} + k_{TSL_{36}}.mRNA_{GS} \quad \text{(A39)}$$

$$R11 = \frac{ATP_{cytosol}}{K_{m(ATP)(GCL)_{72}}\left(1+\frac{GSH_{cytosol}}{K_{is(ATP)(GCL)_{72}}}\right) + ATP_{cytosol}\left(1+\frac{GSH_{cytosol}}{K_{ii(ATP)(GCL)_{72}}}\right)} \quad \text{(A40)}$$

$$R12 = \frac{Glu_{cytosol}}{K_{m(Glu)(GCL)_{72}}\left(1+\frac{GSH_{cytosol}}{K_{is(Glu)(GCL)_{72}}}\right) + Glu_{cytosol}\left(1+\frac{GSH_{cytosol}}{K_{ii(Glu)(GCL)_{72}}}\right)} \quad \text{(A41)}$$

$$R13 = \frac{v_{max(GCL)_{72}}.GCL_{cytosol}.Cys_{cytosol}}{K_{m(Cys)(GCL)_{72}} + Cys_{cytosol}} \quad \text{(A42)}$$

$$R21 = \frac{ATP_{cytosol}}{K_{m(ATP)(GCLC)_{72}}\left(1+\frac{GSH_{cytosol}}{K_{is(ATP)(GCLC)_{72}}}\right) + ATP_{cytosol}\left(1+\frac{GSH_{cytosol}}{K_{ii(ATP)(GCLC)_{72}}}\right)} \quad \text{(A43)}$$

$$R22 = \frac{Glu_{cytosol}}{K_{m(Glu)(GCLC)_{72}}\left(1+\frac{GSH_{cytosol}}{K_{is(Glu)(GCLC)_{72}}}\right) + Glu_{cytosol}\left(1+\frac{GSH_{cytosol}}{K_{ii(Glu)(GCLC)_{72}}}\right)} \quad \text{(A44)}$$

$$R23 = \frac{v_{max(GCLC)_{72}}.GCLC_{cytosol}.Cys_{cytosol}}{K_{m(Cys)(GCLC)_{72}} + Cys_{cytosol}} \quad \text{(A45)}$$

$$R31 = \frac{\frac{\gamma GC_{cytosol}}{K_{m1(\gamma GC)_{73}}} + \frac{\gamma GC^2_{cytosol}}{K_{m1(\gamma GC)_{73}} . K_{m2(\gamma GC)_{73}}}}{1 + \frac{2.\gamma \mathrm{GC}_{cytosol}}{K_{m1(\gamma GC)_{73}}} + \frac{\gamma GC^2_{cytosol}}{K_{m1(\gamma GC)_{73}} . K_{m2(\gamma GC)_{73}}}} \quad \text{(A46)}$$

$$R32 = \frac{v_{max_{73}} . GS_{cytosol} . Gly_{cytosol} . ATP_{cytosol}}{\left(K_{m(Gly)_{73}} + Gly_{cytosol}\right)\left(K_{m(ATP)_{73}} + ATP_{cytosol}\right)} \quad \text{(A47)}$$

$$\frac{\partial \gamma GC_{cytosol}}{\partial t} = R11 \times R12 \times R13 + R21 \times R22 \times R23 - R31 \times R32 \quad \text{(A48)}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial GSH_{cytosol}}{\partial t} = & -\frac{v_{max_{74}} . GSH_{cytosol}}{K_{m_{74}} + GSH_{cytosol}} + R31 \times R32 \\ & - \frac{v_{max_{8b}} . GPx_{cytosol} . GSH_{cytosol}}{K_{m(GSH)_{8b}} + GSH_{cytosol}} . \frac{ROS_{cytosol}}{K_{m(ROS)_{8b}} + ROS_{cytosol}} \end{aligned} \quad \text{(A49)}$$

$$\frac{\partial GPx_{cytosol}}{\partial t} = -k_{deg_{62}} . GPx_{cytosol} + k_{TSL_{59}} . mRNA_{GPx} \quad \text{(A50)}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial Keap1_{cytosol}}{\partial t} = & \; k_{red_{10}} . Keap1o_{cytosol} - k_{ox_{10}} . Keap1_{cytosol} . ROS_{cytosol} \\ & + k_{u_{14}} . Nrf2_Keap1_{cytosol} - k_{b_{14}} . Nrf2_{cytosol} . Keap1_{cytosol} \\ & + k_{u_{12}} . Nrf2_Keap1_{cytosol} \end{aligned} \quad \text{(A51)}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial Keap1o_{cytosol}}{\partial t} = & -k_{red_{10}} . Keap1o_{cytosol} + k_{ox_{10}} . Keap1_{cytosol} . ROS_{cytosol} \\ & + k_{u_{15}} . Nrf2_Keap1o_{cytosol} - k_{b_{15}} . Nrf2_{cytosol} . Keap1o_{cytosol} \\ & + k_{u_{13}} . Nrf2_Keap1o_{cytosol} \end{aligned} \quad \text{(A52)}$$

$$\frac{\partial mRNA_{CYP}}{\partial t} = -k_{deg_{22}} . mRNA_{CYP} + k_{TSP_{21}} . Gene_{CYP_{ON}} \quad \text{(A53)}$$

$$\frac{\partial mRNA_{GCLC}}{\partial t} = -k_{deg_{43}} . mRNA_{GCLC} + k_{TSP_{42}} . Gene_{GCLC_{ON}} \quad \text{(A54)}$$

$$\frac{\partial mRNA_{GCLM}}{\partial t} = -k_{deg_{49}} . mRNA_{GCLM} + k_{TSP_{48}} . Gene_{GCLM_{ON}} \quad \text{(A55)}$$

$$\frac{\partial mRNA_{GS}}{\partial t} = -k_{deg_{35}}.mRNA_{GS}+k_{TSP_{34}}.Gene_{GS_{ON}} \quad \text{(A56)}$$

$$\frac{\partial mRNA_{GPx}}{\partial t} = -k_{deg_{58}}.mRNA_{GPx}+k_{TSP_{57}}.Gene_{GPx_{ON}} \quad \text{(A57)}$$

$$\frac{\partial mRNA_{MRP}}{\partial t} = -k_{deg_{67}}.mRNA_{MRP}+k_{TSP_{66}}.Gene_{MRP_{ON}} \quad \text{(A58)}$$

$$\frac{\partial mRNA_{Nrf2}}{\partial t} = -k_{deg_{29}}.mRNA_{Nrf2}+k_{TSP_{28}}.Gene_{Nrf2_{ON}} \quad \text{(A59)}$$

$$\frac{\partial MRP_{cytosol}}{\partial t} = k_{b_{70}}.MRP_{mono_{cytosol}}.MRP_{mono_{cytosol}}-k_{u_{70}}.MRP_{cytosol} - k_{deg_{71}}.MRP_{cytosol} \quad \text{(A60)}$$

$$\frac{\partial MRP_{mono_{cytosol}}}{\partial t} = -2.k_{b_{70}}.MRP_{mono_{cytosol}}.MRP_{mono_{cytosol}}+2.k_{u_{70}}.MRP_{cytosol} - k_{deg_{69}}.MRP_{mono_{cytosol}}+k_{TSL_{68}}.mRNA_{MRP} \quad \text{(A61)}$$

$$\frac{\partial MAF_{nucleus}}{\partial t} = -k_{b_{18}}.MAF_{nucleus}.Nrf2_{nucleus}+k_{u_{18}}.Nrf2_MAF_{nucleus} \quad \text{(A62)}$$

$$\frac{\partial NMA_{GCLC}}{\partial t} = k_{b_{40}}.ARE_{GCLC}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{40}}-k_{u_{40}}.NMA_{GCLC} \quad \text{(A63)}$$

$$\frac{\partial NMA_{GCLM}}{\partial t} = k_{b_{46}}.ARE_{GCLM}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{46}}-k_{u_{46}}.NMA_{GCLM} \quad \text{(A64)}$$

$$\frac{\partial NMA_{GS}}{\partial t} = k_{b_{32}}.ARE_{GS}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{32}}-k_{u_{32}}.NMA_{GS} \quad \text{(A65)}$$

$$\frac{\partial NMA_{GPx}}{\partial t} = k_{b_{54}}.ARE_{GPx}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{54}}-k_{u_{54}}.NMA_{GPx} \quad \text{(A66)}$$

$$\frac{\partial NMA_{MRP}}{\partial t} = k_{b_{63}}.ARE_{MRP}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{63}}-k_{u_{63}}.NMA_{MRP} \quad \text{(A67)}$$

$$\frac{\partial NMA_{Nrf2}}{\partial t} = k_{b_{25}}.ARE_{Nrf2}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{25}}-k_{u_{25}}.NMA_{Nrf2} \quad \text{(A68)}$$

$$\frac{\partial\, Nrf2_{cytosol}}{\partial\, t} = -k_{deg_{31}}.Nrf2_{cytosol}+k_{TSL_{30}}.mRNA_{Nrf2} -k_{b_{15}}.Nrf2_{cytosol}.Keap1o_{cytosol}+k_{u_{15}}.Nrf2_Keap1o_{cytosol} -k_{b_{14}}.Nrf2_{cytosol}.Keap1_{cytosol}+k_{u_{14}}.Nrf2_Keap1_{cytosol} -CL_{in_{16}}.\frac{Nrf2_{cytosol}}{V_{cytosol}}+CL_{out_{16}}.\frac{Nrf2_{nucleus}}{V_{nucleus}} \quad \text{(A69)}$$

$$\frac{\partial\, Nrf2_{nucleus}}{\partial\, t} = -k_{b_{18}}.Nrf2_{nucleus}.Maf_{nucleus}+k_{u_{18}}.Nrf2_Maf_{nucleus} +CL_{in_{16}}.\frac{Nrf2_{cytosol}}{V_{cytosol}}-CL_{out_{16}}.\frac{Nrf2_{nucleus}}{V_{nucleus}} -k_{deg_{17}}.Nrf2_{nucleus} \quad \text{(A70)}$$

$$\frac{\partial\, Nrf2_Keap1_{cytosol}}{\partial\, t} = k_{red_{11}}.Nrf2_Keap1o_{cytosol}-k_{ox_{11}}.Nrf2_Keap1_{cytosol}.ROS_{cytosol} -k_{u_{14}}.Nrf2_Keap1_{cytosol}+k_{b_{14}}.Nrf2_{cytosol}.Keap1_{cytosol} -k_{u_{12}}.Nrf2_Keap1_{cytosol} \quad \text{(A71)}$$

$$\frac{\partial\, Nrf2_Keap1o_{cytosol}}{\partial\, t} = -k_{red_{11}}.Nrf2_Keap1o_{cytosol} +k_{ox_{11}}.Nrf2_Keap1_{cytosol}.ROS_{cytosol} -k_{u_{15}}.Nrf2_Keap1o_{cytosol}+k_{b_{15}}.Nrf2_{cytosol}.Keap1o_{cytosol} -k_{u_{13}}.Nrf2_Keap1o_{cytosol} \quad \text{(A72)}$$

$$\frac{\partial\, Nrf2_Maf_{nucleus}}{\partial\, t} = -2.k_{b_{54}}.ARE_{GPx}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{54}}+2.k_{u_{54}}.NMA_{GPx} -3.k_{b_{46}}.ARE_{GCLM}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{46}}+3.k_{u_{46}}.NMA_{GCLM} -k_{b_{25}}.ARE_{Nrf2}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{25}}+k_{u_{25}}.NMA_{Nrf2} -2.k_{b_{63}}.ARE_{MRP}.\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{63}}+2.k_{u_{63}}.NMA_{MRP} -3.k_{b_{40}}.ARE_{GCLC}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{40}}+3.k_{u_{40}}.NMA_{GCLC} -2.k_{b_{32}}.ARE_{GS}\left(Nrf2_MAF_{nucleus}\right)^{n_{32}}+2.k_{u_{32}}.NMA_{GS} +k_{b_{18}}.Nrf2_{nucleus}.MAF_{nucleus}-k_{u_{18}}.Nrf2_MAF_{nuleus} \quad \text{(A73)}$$

$$\frac{\partial ROS_{cytosol}}{\partial t} = k_{f_{75}} + k_{ROS}.CsA_{cytosol} - \frac{v_{max_{8b}}.GPx_{cytosol}.GSH_{cytosol}}{K_{m(GSH)_{8b}} + GSH_{cytosol}}.\frac{ROS_{cytosol}}{K_{m(ROS)_{8b}} + ROS_{cytosol}} \quad \text{(A74)}$$

$$\begin{aligned}\frac{\partial XAA_{nucleus}}{\partial t} = & -2.k_{b_{26}}.DRE_{Nrf2}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{26}} + 2.k_{u_{26}}.XAAD_{Nrf2} \\ & -2.k_{b_{19}}.DRE_{CYP}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{19}} + 2.k_{u_{19}}.XAAD_{CYP} \\ & -2.k_{b_{55}}.DRE_{GPx}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{55}} + 2.k_{u_{55}}.XAAD_{GPx} \\ & -k_{b_{64}}.DRE_{MRP}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{64}} + k_{u_{64}}.XAAD_{MRP} \\ & +k_{b_6}.X_AhR_{nucleus}.ARNT_{nucleus} - k_{u_6}.XAA_{nucleus}\end{aligned} \quad \text{(A75)}$$

$$\frac{\partial XAAD_{CYP}}{\partial t} = k_{b_{19}}.DRE_{CYP}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{19}} - k_{u_{19}}.XAAD_{CYP} \quad \text{(A76)}$$

$$\frac{\partial XAAD_{GPx}}{\partial t} = k_{b_{55}}.DRE_{GPx}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{55}} - k_{u_{55}}.XAAD_{GPx} \quad \text{(A77)}$$

$$\frac{\partial XAAD_{MRP}}{\partial t} = k_{b_{64}}.DRE_{MRP}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{64}} - k_{u_{64}}.XAAD_{MRP} \quad \text{(A78)}$$

$$\frac{\partial XAAD_{Nrf2}}{\partial t} = k_{b_{26}}.DRE_{Nrf2}\left(XAA_{nucleus}\right)^{n_{26}} - k_{u_{26}}.XAAD_{Nrf2} \quad \text{(A79)}$$

Tableaux récapitulatifs des paramètres.

Equation	Paramètres et valeurs initiales des variables d'état
A1 : $\frac{\partial AhR_{cytosol}}{\partial t}$	$AhR_{cytosol_{(initial)}}$ = 34 zmol k_{b_2} = 0 zmol^{-1}.s^{-1} k_{u_2} = 0,02 s^{-1}
A2 : $\frac{\partial AhR_{nucleus}}{\partial t}$	$AhR_{nucleus_{(initial)}}$ = 0 zmol k_{b_5} = 0 zmol^{-1}.s^{-1} k_{u_5} = 0,02 s^{-1}
A3 : $\frac{\partial ARE_{GCLC}}{\partial t}$	$k_{b_{40}}$ = 14,6 zmol^{-3}.s^{-1} $k_{u_{40}}$ = 0,02 s^{-1} n_{40} = 3 $ARE_{GCLC_{(initial)}}$ = 6,35E^{-4} zmol
A4 : $\frac{\partial ARE_{GCLM}}{\partial t}$	$k_{b_{46}}$ = 14,6 zmol^{-3}.s^{-1} $k_{u_{46}}$ = 0,02 s^{-1} n_{46} = 3 $ARE_{GCLM_{(initial)}}$ = 6,35.E^{-4} zmol
A5 : $\frac{\partial ARE_{GS}}{\partial t}$	$k_{b_{32}}$ = 0,29 zmol^{-2}.s^{-1} $k_{u_{32}}$ = 0,02 s^{-1} n_{32} = 2 $ARE_{GS_{(initial)}}$ = 6,35E^{-4} zmol
A6 : $\frac{\partial ARE_{GPx}}{\partial t}$	$k_{b_{54}}$ = 0,29 zmol^{-2}.s^{-1} $k_{u_{54}}$ = 0,02 s^{-1} n_{54} = 2 $ARE_{GPx_{(initial)}}$ = 6,35E^{-4} zmol
A7 : $\frac{\partial ARE_{MRP}}{\partial t}$	$k_{b_{63}}$ = 0,29 zmol^{-2}.s^{-1} $k_{u_{63}}$ = 0,02 s^{-1} n_{63} = 2 $ARE_{MRP_{(initial)}}$ = 6,35E^{-3} zmol
A8 : $\frac{\partial ARE_{Nrf2}}{\partial t}$	$k_{b_{25}}$ = 5,26E-3 zmol^{-1}.s^{-1} $k_{u_{25}}$ = 0,02 s^{-1} n_{25} = 1 $ARE_{Nrf2_{(initial)}}$ = 6,35E^{-3} zmol
A9 : $\frac{\partial ARNT_{Nucleus}}{\partial t}$	$ARNT_{Nucleus_{(initial)}}$ = 1,1 zmol k_{b_6} = 0,05 zmol^{-1}.s^{-1} k_{u_6} = 0,2 s^{-1}

Equation	Paramètres et valeurs initiales des variables d'état		
A10: $\frac{\partial CsA_{cytosol}}{\partial t}$ A11: $\frac{\partial CsA_{extracellar}}{\partial t}$ A12: $\frac{\partial CsA_{nuleus}}{\partial t}$ A13: $\frac{\partial CsA_{wall}}{\partial t}$	$V_{cytosol}$ = 1702 µm3	CL_{in_1} = 99,6 zmol.sec^{-1}	CL_{out_1} = 1483 zmol.sec^{-1}
	$V_{nucleus}$ = 380 µm3	Km_{out_1} = 2965 µmol.L^{-1}	k_3 = 0,921
	$CsA_{cytosol_{(initial)}}$ = variable	V_{max_2} = 0,2 sec^{-1}	Km_2 = 2,18E^6 zmol
	$CsA_{wall_{(initial)}}$ = 0 zmol	CL_{in_4} = CL_{in_1}	CL_{out_4} = CL_{out_1}
	$CsA_{nucleus_{(initial)}}$ = 0 zmol	k_1 = 3,55E^{-5} sec^{-1}	
	k_2 = 6,01E^{-4} zmol$^{(1-k3)}$.sec^{-1}	Se référer aux équations A1 et A2 pour les autres paramètres.	
A14: $\frac{\partial CsA_AhR_{cytosol}}{\partial t}$	$CsA_AhR_{cytosol_{(initial)}}$ = 0 zmol	CL_{in_3} = 10 µm^3.s^{-1}	CL_{out_3} = 1 µm^3.sec^{-1}
	Se référer à l'équation A1 pour les autres paramètres.		
A15: $\frac{\partial CsA_AhR_{nucleus}}{\partial t}$	$CsA_AhR_{nucleus_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer aux équations A2, A9 et A14 pour les autres paramètres.	
A16: $\frac{\partial CYP_{cytosol}}{\partial t}$	$CYP_{cytosol_{(initial)}}$ = 34 zmol	$k_{deg_{24}}$ = 1E^{-4} s^{-1}	$k_{TSL_{23}}$ = 0,041 s^{-1}
A17: $\frac{\partial DRE_{CYP}}{\partial t}$	$k_{b_{19}}$ = 1,39 zmol^{-2}.s^{-1}	$k_{u_{19}}$ = 0,018 s^{-1}	n_{19} = 2
		$DRE_{CYP_{(initial)}}$ = 6,35E^{-4} zmol	
A18: $\frac{\partial DRE_{GPx}}{\partial t}$	$k_{b_{55}}$ = 13,9 zmol^{-2}.s^{-1}	$k_{u_{55}}$ = 0,02 s^{-1}	n_{55} = 2
		$DRE_{GPx_{(initial)}}$ = 6,35E^{-4} zmol	
A19: $\frac{\partial DRE_{MRP}}{\partial t}$	$k_{b_{64}}$ = 0,26 zmol^{-2}.s^{-1}	$k_{u_{64}}$ = 0,02 s^{-1}	n_{64} = 1
		$DRE_{MRP_{(initial)}}$ = 6,35E^{-4} zmol	
A20: $\frac{\partial DRE_{Nrf2}}{\partial t}$	$k_{b_{26}}$ = 13,9 zmol^{-2}.s^{-1}	$k_{u_{26}}$ = 0,02 s^{-1}	n_{26} = 2
		$DRE_{Nrf2_{(initial)}}$ = 6,35E^{-4} zmol	
A21: $\frac{\partial GCL_{cytosol}}{\partial t}$	$k_{b_{52}}$ = -[a]	$k_{u_{52}}$ = 0,02 s^{-1}	$k_{deg_{53}}$ = 3,86E^{-5} s^{-1}
		$GCL_{cytosol_{(initial)}}$ = 1020 zmol	

-[a] : paramètre estimé.

Equation	Paramètres et valeurs initiales des variables d'état		
A22: $\frac{\partial GCLC_{cytosol}}{\partial t}$	$GCLC_{cytosol_{(initial)}}$ = 2890 zmol	$k_{deg_{45}}$ = 3,86E^{-5} s^{-1}	$k_{TSL_{44}}$ = 0,0417 s^{-1}
	Se référer à l'équation A21 pour les autres paramètres.		
A23: $\frac{\partial GCLM_{cytosol}}{\partial t}$	$GCLM_{cytosol_{(initial)}}$ = 612 zmol	$k_{deg_{51}}$ = 3,86E^{-5} s^{-1}	$k_{TSL_{50}}$ = 0,0417 s^{-1}
	Se référer à l'équation A21 pour les autres paramètres.		
A24: $\frac{\partial Gene_{CYP_{OFF}}}{\partial t}$	$Gene_{CYP_{OFF_{(initial)}}}$ = 6,35E^{-4} zmol	$k_{act_{20}}$ = 2,5E^{-5} s^{-1}	$k_{desact_{20}}$ = 0,01 s^{-1}
A25: $\frac{\partial Gene_{CYP_{ON}}}{\partial t}$	$Gene_{CYP_{ON_{(initial)}}}$ = 0 zmol	$k_{ind(NMA)_{20}}$ = 0,079 zmol^{-1}.s^{-1}	
A26: $\frac{\partial Gene_{GCLC_{OFF}}}{\partial t}$	$Gene_{GCLC_{OFF_{(initial)}}}$ = 6,35E^{-4} zmol	$k_{act_{41}}$ = 4E^{-4} s^{-1}	$k_{desact_{41}}$ = 0,01 s^{-1}
A27: $\frac{\partial Gene_{GCLC_{ON}}}{\partial t}$	$Gene_{GCLC_{ON_{(initial)}}}$ = 0 zmol	$k_{ind_{41}}$ = -[a]	
A28: $\frac{\partial Gene_{GCLM_{OFF}}}{\partial t}$	$Gene_{GCLM_{OFF_{(initial)}}}$ = 6,35E^{-4} zmol	$k_{act_{47}}$ = 4E^{-4} s^{-1}	$k_{desact_{47}}$ = 0,01 s$^{¨}$
A29: $\frac{\partial Gene_{GCLM_{ON}}}{\partial t}$	$Gene_{GCLM_{ON_{(initial)}}}$ = 0 zmol	$k_{ind(NMA)_{47}}$ = -[a]	
A30: $\frac{\partial Gene_{GS_{OFF}}}{\partial t}$	$Gene_{GS_{OFF_{(initial)}}}$ = 6,35E^{-4} zmol	$k_{act_{33}}$ = 5E^{-4} s^{-1}	$k_{desact_{33}}$ = 0,01 s^{-1}
A31: $\frac{\partial Gene_{GS_{ON}}}{\partial t}$	$Gene_{GS_{ON_{(initial)}}}$ = 0 zmol	$k_{ind(NMA)_{33}}$ = -[a]	
A32: $\frac{\partial Gene_{GPx_{OFF}}}{\partial t}$	$Gene_{GPx_{OFF_{(initial)}}}$ = 6,35E^{-4} zmol	$k_{act_{56}}$ = 1E^{-3} s^{-1}	$k_{desact_{56}}$ = 0,01 s^{-1}
A33: $\frac{\partial Gene_{GPx_{ON}}}{\partial t}$	$Gene_{GPx_{ON_{(initial)}}}$ = 0 zmol	$k_{ind(NMA)_{56}}$ = -[a]	$k_{ind(XAAD)_{56}}$ = 0,26 zmol^{-1}.s^{-1}
A34: $\frac{\partial Gene_{MRP_{OFF}}}{\partial t}$	$Gene_{MRP_{OFF_{(initial)}}}$ = 6,35E^{-4} zmol	$k_{act_{65}}$ = 6,8E^{-4} s^{-1}	$k_{desact_{65}}$ = 0,01 s^{-1}
A35: $\frac{\partial Gene_{MRP_{ON}}}{\partial t}$	$Gene_{MRP_{ON_{(initial)}}}$ = 0 zmol	$k_{ind(NMA)_{65}}$ = -[a]	$k_{ind(XAAD)_{65}}$ = 1,32 zmol^{-1}.s^{-1}

-[a] : paramètre estimé.

Equation	Paramètres et valeurs initiales des variables d'état		
A36: $\frac{\partial Gene_{Nrf2_{OFF}}}{\partial t}$ A37: $\frac{\partial Gene_{Nrf2_{ON}}}{\partial t}$	$Gene_{Nrf2_{OFF}(initial)}$ = 6,35E^{-4} zmol	$k_{act_{27}}$ = 2,5E^{-3} s^{-1}	$k_{desact_{27}}$ = 0,01 s^{-1}
	$Gene_{Nrf2_{ON}(initial)}$ = 0 zmol	$k_{ind(NMA)_{27}}$ = -[a]	$k_{ind(XAAD)_{27}}$ = 13 zmol^{-1}.s^{-1}
A38: $\frac{\partial GS_{cytosol}}{\partial t}$ A39: $\frac{\partial GSmono_{cytosol}}{\partial t}$	$k_{b_{38}}$ = 1,2E^{-4} zmol^{-1}.s^{-1}	$k_{u_{38}}$ = 0,02 s^{-1}	$k_{deg_{39}}$ = 1,93E^{-5} s^{-1}
	$GS_{cytosol(initial)}$ = 1632 zmol	$k_{TSL_{36}}$ = 0,0417 s^{-1}	$k_{deg_{37}}$ = 3,86E^{-5} s^{-1}
	$GSmono_{cytosol(initial)}$ = 0 zmol		
A48: $\frac{\partial \gamma GC_{cytosol}}{\partial t}$	$Gly_{cytosol}$ = 1,7E^{6} zmol	$K_{m1_{73}}$ = 11,2E^{5} zmol	$K_{m2_{73}}$ = 2,6E^{6} zmol
	$ATP_{cytosol}$ = 8,5E^{6} zmol	$Glu_{cytosol}$ = 1,7E^{7} zmol	$Cys_{cytosol}$ = 5,1E^{5} zmol
	$v_{max_{73}}$ = -[a]	$K_{m(Gly)_{73}}$ = 3E^{6} zmol	$K_{m(ATP)_{73}}$ = 12E^{4} zmol
	$K_{m(Glu)(GCL)_{72}}$ = 8,2E^{5} zmol	$v_{max(GCL)_{72}}$ = -[a]	$v_{max(GCLC)_{72}}$ = -[a]
	$\gamma GC_{cytosol(initial)}$ = 2,6E^{5} zmol	$K_{m(ATP)(GCLC)_{72}}$ = 8,5E^{6} zmol	$K_{is(ATP)(GCLC)_{72}}$ = 2,2E^{6} zmol
	$K_{m(ATP)(GCL)_{72}}$ = 14,8E^{5} zmol	$K_{ii(ATP)(GCLC)_{72}}$ = 6,8E^{5} zmol	$K_{m(Glu)(GCLC)_{72}}$ = 2,7E^{6} zmol
	$K_{is(ATP)(GCL)_{72}}$ = 11E^{6} zmol	$K_{is(Glu)(GCLC)_{72}}$ = 5,1E^{5} zmol	$K_{ii(Glu)(GCLC)_{72}}$ = 14E^{5} zmol
	$K_{ii(ATP)(GCL)_{72}}$ = 6,6E^{6} zmol	$K_{m(Cys)(GCL)_{72}}$ = 3,7E^{5} zmol	$K_{m(Cys)(GCLC)_{72}}$ = 4,6E^{5} zmol
	$K_{is(Glu)(GCL)_{72}}$ = 14E^{5} zmol	$K_{ii(Glu)(GCL)_{72}}$ = 5,3E^{6} zmol	
A49: $\frac{\partial GSH_{cytosol}}{\partial t}$	$GSH_{cytosol(initial)}$ = 8,5E^{6} zmol	$v_{max_{74}}$ = 3137 zmol.s^{-1}	$K_{m_{74}}$ = 3,4E^{7} zmol
	$K_{i(GSH)_{8b}}$ = 14,5E^{4} zmol	$K_{m(GSH)_{8b}}$ = 8,5E^{5} zmol	$v_{max_{8b}}$ = -[a]
	$K_{m(ROS)_{8b}}$ = 8,5E^{4} zmol	$K_{i(ROS)_{8b}}$ = 14,5E^{4} zmol	Se référer à l'équation A48 pour les autres paramètres.

-[a] : paramètre estimé.

Equation	Paramètres et valeurs initiales des variables d'état		
A50: $\frac{\partial GPx_{cytosol}}{\partial t}$	$GPx_{cytosol_{(initial)}}$ = 250 zmol	$k_{TSL_{59}}$ = 0,0417 s^{-1}	$k_{deg_{62}}$ = 1,29E^{-5} s^{-1}
A51: $\frac{\partial Keap1_{cytosol}}{\partial t}$ A52: $\frac{\partial Keap1o_{cytosol}}{\partial t}$	$Keap1_{cytosol_{(initial)}}$ = 34 zmol $Keap1o_{cytosol_{(initial)}}$ = 0 zmol $k_{u_{12}}$ = 0,014 s^{-1} $k_{u_{13}}$ = 1E^{-4} s^{-1}	$k_{red_{10}}$ = 0,1 s^{-1} $k_{b_{14}}$ = 3,4E^{-3} zmol.s^{-1} $k_{b_{15}}$ = 3,4E^{-3} zmol.s^{-1}	$k_{ox_{10}}$ = -[a] $k_{u_{14}}$ = 0,02 s^{-1} $k_{u_{15}}$ = 0,02 s^{-1}
A53: $\frac{\partial mRNA_{CYP}}{\partial t}$	$mRNA_{CYP_{(initial)}}$ = 0,787 zmol	$k_{TSP_{21}}$ = -[a]	$k_{deg_{22}}$ = 6E^{-5} s^{-1}
A54: $\frac{\partial mRNA_{GCLC}}{\partial t}$	$mRNA_{GCLC_{(initial)}}$ = 3,08 zmol	$k_{TSP_{42}}$ = -[a]	$k_{deg_{43}}$ = 4,83E^{-5} s^{-1}
A55: $\frac{\partial mRNA_{GCLM}}{\partial t}$	$mRNA_{GCLM_{(initial)}}$ = 1,33 zmol	$k_{TSP_{48}}$ = -[a]	$k_{deg_{49}}$ = 4,83E-5 s^{-1}
A56: $\frac{\partial mRNA_{GS}}{\partial t}$	$mRNA_{GS_{(initial)}}$ = 0,731 zmol	$k_{TSP_{34}}$ = -[a]	$k_{deg_{35}}$ = 4,83E-5 s^{-1}
A57: $\frac{\partial mRNA_{GPx}}{\partial t}$	$mRNA_{GPx_{(initial)}}$ = 0,731 zmol	$k_{TSP_{57}}$ = -[a]	$k_{deg_{58}}$ = 4,71E-5 s^{-1}
A58: $\frac{\partial mRNA_{MRP}}{\partial t}$	$mRNA_{MRP_{(initial)}}$ = 6,46 zmol	$k_{TSP_{66}}$ = -[a]	$k_{deg_{67}}$ = 1,93E-5 s^{-1}
A59: $\frac{\partial mRNA_{Nrf2}}{\partial t}$	$mRNA_{Nrf2_{(initial)}}$ = 0,046 zmol	$k_{TSP_{28}}$ = -[a]	$k_{deg_{29}}$ = 6,43E-5 s^{-1}
A60: $\frac{\partial MRP_{cytosol}}{\partial t}$ A61: $\frac{\partial MRPmono_{cytosol}}{\partial t}$	$k_{b_{70}}$ = 0,59E^{-5} $zmol^{-1}.s^{-1}$ $MRP_{cytosol_{(initial)}}$ = 3,4E^{3} zmol $MRPmono_{cytosol_{(initial)}}$ = 3,4E^{3} zmol	$k_{u_{70}}$ = 0.02 s^{-1} $k_{TSL_{68}}$ = 0,0417 s^{-1}	$k_{deg_{71}}$ = 7,15E^{-6} s^{-1} $k_{deg_{69}}$ = 1,93E^{-5} s^{-1}
A62: $\frac{\partial MAF_{nucleus}}{\partial t}$	$MAF_{nucleus_{(initial)}}$ = 0,038 zmol	$k_{b_{18}}$ = -[a]	$k_{u_{18}}$ = 0,02 s^{-1}
A63: $\frac{\partial NMA_{GCLC}}{\partial t}$	$NMA_{GCLC_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A3.	
A64: $\frac{\partial NMA_{GCLM}}{\partial t}$	$NMA_{GCLM_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A4.	
A65: $\frac{\partial NMA_{GS}}{\partial t}$	$NMA_{GS_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A5.	
A66: $\frac{\partial NMA_{GPx}}{\partial t}$	$NMA_{GPx_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A6.	
A67: $\frac{\partial NMA_{MRP}}{\partial t}$	$NMA_{MRP_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A7.	

-[a] : paramètre estimé.

Equation	Paramètres et valeurs initiales des variables d'état		
A68: $\frac{\partial NMA_{Nrf2}}{\partial t}$	$NMA_{Nrf2_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A8.	
A69: $\frac{\partial Nrf2_{cytosol}}{\partial t}$ A70: $\frac{\partial Nrf2_{nucleus}}{\partial t}$	$Nrf2_{cytosol_{(initial)}}$ = 0,85 zmol	$k_{deg_{31}}$ = 1E^{-4} s^{-1}	$k_{TSL_{30}}$ = 0,0417 s^{-1}
	$Nrf2_{nucleus_{(initial)}}$ = 0,038 zmol	$CL_{in_{16}}$ = 2 µm3.s^{-1}	$CL_{out_{16}}$ = 1 µm3.s^{-1}
	$k_{deg_{17}}$ = 1E^{-4} s^{-1}	Se référer aux équations A52, A61 et A62 pour les autres paramètres.	
A71: $\frac{\partial Nrf2_Keap1_{cytosol}}{\partial t}$	$Nrf2_Keap1_{cytosol_{(initial)}}$ = 0 zmol	$k_{red_{11}}$ = 0,1 s^{-1}	
A72: $\frac{\partial Nrf2_Keap1o_{cytosol}}{\partial t}$	$Nrf2_Keap1o_{cytosol_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer aux équations A52, A61 et A62 pour les autres paramètres.	
A73 : $\frac{\partial Nrf2_MAF_{nucleus}}{\partial t}$	$Nrf2_MAF_{nucleus_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer aux équations A3, A4, A5, A6, A7, A8 et A62 pour les autres paramètres.	
A74: $\frac{\partial ROS_{cytosol}}{\partial t}$	$ROS_{cytosol_{(initial)}}$ = 0 zmol	$k_{f_{75}}$ = -[a]	k_{ROS} = -[a]
	Se référer à l'équation A49 pour les autres paramètres.		
A75: $\frac{\partial XAA_{nucleus}}{\partial t}$	$XAA_{nucleus_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer aux équations A9, A17, A18, A19 et A20 pour les autres paramètres.	
A76: $\frac{\partial XAAD_{CYP}}{\partial t}$	$XAAD_{CYP_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A17 pour les autres paramètres.	
A77: $\frac{\partial XAAD_{GPx}}{\partial t}$	$XAAD_{GPx_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A18 pour les autres paramètres..	
A78: $\frac{\partial XAAD_{MRP}}{\partial t}$	$XAAD_{MRP_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A19 pour les autres paramètres..	
A79: $\frac{\partial XAAD_{Nrf2}}{\partial t}$	$XAAD_{Nrf2_{(initial)}}$ = 0 zmol	Se référer à l'équation A20 pour les autres paramètres..	

-[a] : paramètre estimé.

Tableaux récapitulatifs des données utilisées pour calibrer les modèles PK *in vitro* et PKSB.

Tableau A1 : Quantités de CsA mesurées dans le milieu extracellulaire (3 mL) pour la faible concentration (5 µM).

Jour	Temps (heure)	Quantité de CsA (zeptomol)		
		Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
1	0,5	$5{,}229.10^{-6}$	$5{,}105.10^{-6}$	$4{,}667.10^{-6}$
	1	$4{,}667.10^{-6}$	$5{,}000.10^{-6}$	$3{,}924.10^{-6}$
	3	$5{,}076.10^{-6}$	$4{,}695.10^{-6}$	$4{,}657.10^{-6}$
	6	$4{,}610.10^{-6}$	$4{,}743.10^{-6}$	$4{,}343.10^{-6}$
	24	$4{,}686.10^{-6}$	$4{,}352.10^{-6}$	$3{,}810.10^{-6}$
3	24	$5{,}781.10^{-6}$	$5{,}619.10^{-6}$	$5{,}210.10^{-6}$
5	24	$6{,}010.10^{-6}$	$5{,}771.10^{-6}$	$6{,}010.10^{-6}$
7	24	$5{,}076.10^{-6}$	$6{,}048.10^{-6}$	$5{,}771.10^{-6}$
10	24	$5{,}562.10^{-6}$	$5{,}410.10^{-6}$	$5{,}181.10^{-6}$
14	0,5	$4{,}905.10^{-6}$	$5{,}962.10^{-6}$	$5{,}219.10^{-6}$
	1	$5{,}333.10^{-6}$	$5{,}610.10^{-6}$	$5{,}076.10^{-6}$
	3	$5{,}124.10^{-6}$	$5{,}314.10^{-6}$	$4{,}419.10^{-6}$
	6	$5{,}943.10^{-6}$	$5{,}562.10^{-6}$	$5{,}162.10^{-6}$
	24	$5{,}238.10^{-6}$	$5{,}295.10^{-6}$	$4{,}971.10^{-6}$

Tableau A2 : Quantités de CsA intracellulaire mesurées pour la faible concentration (5 µM).

Jour	Temps (heure)	Quantité de CsA (in zeptomol)		
		Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
1	0,5	$1{,}248.10^{-6}$	$1{,}181.10^{-6}$	9,048E-.10^{-7}
	1	$1{,}286.10^{-6}$	$1{,}152.10^{-6}$	$1{,}114.10^{-6}$
	3	$1{,}390.10^{-6}$	$1{,}362.10^{-6}$	$1{,}381.10^{-6}$
	6	$1{,}152.10^{-6}$	$1{,}248.10^{-6}$	$1{,}124.10^{-6}$
	24	$1{,}657.10^{-6}$	$1{,}305.10^{-6}$	$1{,}171.10^{-6}$
14	0,5	$1{,}771.10^{-6}$	$2{,}414.10^{-6}$	$2{,}086.10^{-6}$
	1	$3{,}271.10^{-6}$	$3{,}771.10^{-6}$	$3{,}886.10^{-6}$
	3	$2{,}600.10^{-6}$	$1{,}886.10^{-6}$	$2{,}100.10^{-6}$
	6	$1{,}914.10^{-6}$	$2{,}000.10^{-6}$	$2{,}543.10^{-6}$
	24	$2{,}043.10^{-6}$	$2{,}229.10^{-6}$	$2{,}514.10^{-6}$

Tableau A3 : Quantités de CsA mesurées sur les parois des puits pour la faible concentration (5 µM).

Jour	Temps (heure)	Quantité de CsA (zeptomol)		
		Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
1	0,5	$6{,}143.10^{-7}$	$7{,}095.10^{-7}$	$7{,}286.10^{-7}$
	1	$5{,}762.10^{-7}$	$6{,}429.10^{-7}$	$6{,}619.10^{-7}$
	3	$5{,}810.10^{-7}$	$7{,}667.10^{-7}$	$5{,}905.10^{-7}$
	6	$7{,}905.10^{-7}$	$8{,}333.10^{-7}$	$8{,}095.10^{-7}$
	24	$7{,}714.10^{-7}$	$1{,}024.10^{-6}$	$1{,}019.10^{-6}$
14	0,5	$1{,}010.10^{-6}$	$9{,}810.10^{-7}$	$8{,}952.10^{-7}$
	1	$9{,}048.10^{-7}$	$9{,}905.10^{-7}$	$1{,}062.10^{-6}$
	3	$1{,}414.10^{-6}$	$1{,}229.10^{-6}$	$1{,}462.10^{-6}$
	6	$9{,}238.10^{-7}$	$9{,}429.10^{-7}$	$8{,}762.10^{-7}$
	24	$7{,}524.10^{-7}$	$6{,}333.10^{-7}$	$8{,}000.10^{-7}$

Tableau A4 : Quantités de CsA mesurées dans le milieu extracellulaire (3 mL) pour la forte concentration (15 µM).

Jour	Temps (heure)	Quantité de CsA (zeptomol)		
		Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
1	0,5	1,888.10-5	2,057.10-5	1,693.10-5
	1	1,686.10-5	1,733.10-5	1,636.10-5
	3	1,557.10-5	1,788.10-5	1,674.10-5
	6	1,555.10-5	1,583.10-5	1,745.10-5
	24	1,581.10-5	1,660.10-5	1,490.10-5
3	24	1,664.10-5	1,355.10-5	1,538.10-5
5	24	1,674.10-5	1,729.10-5	1,605.10-5
7	24	1,519.10-5	1,612.10-5	1,419.10-5
10	24	1,652.10-5	1,683.10-5	1,757.10-5
14	0,5	1,917.10-5	2,076.10-5	1,962.10-5
	1	2,033.10-5	2,007.10-5	1,899.10-5
	3	1,855.10-5	1,886.10-5	1,833.10-5
	6	1,836.10-5	1,850.10-5	1,843.10-5
	24	1,643.10-5	1,612.10-5	1,717.10-5

Tableau A5 : Quantités de CsA intracellulaire mesurées pour la forte concentration (15 µM).

Jour	Temps (heure)	Quantité de CsA (zeptomol)		
		Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
1	0,5	$2{,}010.10^{-6}$	$1{,}671.10^{-6}$	$1{,}619.10^{-7}$
	1	$1{,}852.10^{-6}$	$2{,}086.10^{-6}$	$1{,}762.10^{-6}$
	3	$2{,}643.10^{-6}$	$2{,}500.10^{-6}$	$2{,}029.10^{-6}$
	6	$2{,}643.10^{-6}$	$2{,}310.10^{-6}$	$2{,}548.10^{-6}$
	24	$3{,}714.10^{-5}$	$2{,}548.10^{-6}$	$3{,}429.10^{-6}$
14	0,5	$2{,}222.10^{-5}$	$2{,}191.10^{-5}$	$1{,}696.10^{-5}$
	1	$2{,}160.10^{-5}$	$2{,}303.10^{-5}$	$2{,}371.10^{-5}$
	3	$1{,}350.10^{-5}$	$1{,}647.10^{-5}$	$1{,}548.10^{-5}$
	6	$1{,}603.10^{-5}$	$1{,}727.10^{-5}$	$2{,}315.10^{-5}$
	24	$1{,}467.10^{-5}$	$1{,}356.10^{-5}$	$1{,}418.10^{-5}$

Tableau A6 : Quantités de CsA mesurées sur les parois des puits pour la forte concentration (15 µM).

Jour	Temps (heure)	Quantité de CsA (zeptomol)		
		Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
1	0,5	$4{,}190.10^{-7}$	$5{,}238.10^{-7}$	$6{,}857.10^{-7}$
	1	$6{,}429.10^{-7}$	$8{,}782.10^{-7}$	$8{,}857.10^{-7}$
	3	$1{,}533.10^{-7}$	$9{,}000.10^{-7}$	$9{,}810.10^{-7}$
	6	$7{,}810.10^{-7}$	$1{,}143.10^{-6}$	$1{,}105.10^{-6}$
	24	$7{,}143.10^{-7}$	$1{,}090.10^{-6}$	$6{,}381.10^{-7}$
14	0,5	$5{,}905.10^{-6}$	$4{,}552.10^{-6}$	$5{,}000.10^{-6}$
	1	$6{,}390.10^{-6}$	$6{,}181.10^{-6}$	$7{,}067.10^{-6}$
	3	$8{,}752.10^{-6}$	$7{,}905.10^{-6}$	$4{,}848.10^{-6}$
	6	$6{,}248.10^{-6}$	$4{,}829.10^{-6}$	$4{,}448.10^{-6}$
	24	$5{,}086.10^{-6}$	$6{,}305.10^{-6}$	$5{,}762.10^{-6}$

Tableau A7 : FC des données omiques pour la faible concentration en CsA administrée (5 µM).

Espèce	Jour 1			Jour 3			Jour 14		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
ARNm CYP	1,115	/	/	1,050	/	/	0,945	/	/
ARNm GCLC	1,043	1,046	/	1,093	1,038	/	1,022	0,995	/
ARNm GCLM	0,999	0,897	/	1,198	1,169	/	1,168	1,316	/
ARNm GS	0,951	/	/	0,886	/	/	0,971	/	/
ARNm GPx	1,069	1,054	/	0,948	0,981	/	1,081	1,033	/
ARNm MRP	1,086	/	/	1,093	/	/	1,133	/	/
ARNm Nrf2	0,935	/	/	1,329	/	/	1,156	/	/
GCLM	/	/	/	1,069	/	/	/	/	/
GS	0,949	1,010	1,020	0,952	0,964	1,017	0,971	1,003	1,040
GSH	1,092	1,702	0,701	1,416	0,799	1,428	1,945	0,932	1,468
γ-GC	4,602	39,391	2,869	5,192	1,538	2,135	0,542	2,749	0,232
MRP	/	/	/	/	/	/	0,782	/	/

Tableau A8 : FC des données omiques pour la forte concentration en CsA administrée (15 µM).

Espèce	Jour 1			Jour 3			Jour 14		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
ARNm CYP	1,099	/	/	1,004	/	/	1,211	/	/
ARNm GCLC	3,425	1,299	/	1,945	1,211	/	2,478	1,206	/
ARNm GCLM	2,755	4,709	/	2,848	5,154	/	1,769	2,785	/
ARNm GS	0,764	/	/	0,728	/	/	0,816	/	/
ARNm GPx	1,056	1,077	/	1,010	0,980	/	0,986	0,974	/
ARNm MRP	1,317	/	/	1,194	/	/	1,081	/	/
ARNm Nrf2	1,133	/	/	1,408	/	/	1,261	/	/
GCLM	/	/	/	1,431	/	/	/	/	/
GS	0,971	1,035	0,973	0,955	0,988	1,040	0,943	0,980	1,007
GSH	2,093	1,423	4,528	7,063	8,376	4,216	5,017	2,899	6,975
γ-GC	30,13	181,4	11,38	92,085	525,6	32,53	14,237	39,93	6,953
MRP	/	/	/	/	/	/	0,775	/	/

Chapter 15: Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling

(chapitre issu de *Pharmacokinetics: Concepts and Applications in Drug Discovery and Development*, Ruiz-Garcia A., Casabo V.G. Eds., John Wiley & sons, Hoboken)

Jérémy Hamon[1], Thomas Perez Schönberg[1], Frédéric Y. Bois[1,2*]

[1] Chaire de Modélisation Mathématique pour la Toxicologie Systémique, Université de Technologie de Compiègne, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France

[2] INERIS, DRC/VIVA/METO, Parc ALATA, BP 2, 60550 Verneuil en Halatte, France

* Corresponding author; phone: 33-03-44234385; email: frederic.bois@utc.fr

Abstract

This chapter covers the basics of physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling, from model building, parameterisation and solving, to current applications in pharmacology (lead optimization, understanding the pharmacokinetics of the active drug, first dosing in humans, individualising treatments, predicting metabolic interactions in co-treatments and reconstructing dose). A number of issues or development perspectives (coupling to QSAR models, refined organ descriptions, finer description of metabolism, feedback effects from pharmacodynamics, lifetime models, population specific models, integration of medical imaging data and of *in vitro* toxicity assays) are finally discussed.

1. Introduction - Historical Development

The therapeutic or toxic effects of chemical substances not only depend on interactions with biomolecules at the cellular level (the corresponding discipline being pharmacodynamics, PD), but also on their pharmacokinetics (PK). PK and PD first aim at a qualitative understanding of the underlying biology. They also use mathematical models to analyze and extrapolate measurements of various biomarkers of exposure, susceptibility or effect, in order to quantitatively predict effects. This chapter focuses on physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models, whose mechanistic basis renders particularly apt at various types of extrapolations.

The first works in pharmacokinetic modeling [1-6] were based on physiological descriptions of the body. However, at the time, the corresponding mathematical models were too complex to be solved.

Research and applications then focused on simpler one-, two- or three-compartment models [7], which proved to be adequate for describing and interpolating concentration-time profiles of many drugs in blood or other biological matrices. However, for substances with complex kinetics, or when inter-species extrapolations were required, simple models were insufficient and research continued on physiological models [8-12].

Over the years, the ever-increasing computing capabilities and the advent of statistical approaches applicable to uncertainty and population variability modeling have turned PBPK models into well-developed tools for safety assessment of chemical substances [13]. A significant advance has been the development of quantitative structure-properties models for the chemical-dependent parameters of PBPK models (*e.g.*, tissue affinities) [14]. Those developments are still on-going and have led to large generic models which can give quick, even if approximate, answers to pharmacokinetic questions, solely on the basis of a chemical's formula and limited *in vitro* data (on metabolism, in particular) [15].

To provide a general overview of the basis and applications of PBPK modeling, the first section of this chapter describes the formulation of a PBPK model. We then cover the determination of parameter values and related variability issues. We then give two examples of PBPK modeling, first for cyclosporine A, and next for a nanoparticle-based diagnostic agent (Technegas®). We finally describe generic applications of PBPK models, and discuss some perspectives on their development.

2. Building a PBPK Model

2.1. Principles and model equations

A PBPK model represents the organism of interest - human, rat, mouse, *etc*. - as a set of compartments, each corresponding to an organ, group of organs or tissues (*e.g*., adipose tissue, bone, brain, gut) having similar blood perfusion rate (or permeability) and affinity for the substance of interest. Transport between those compartments by blood, lymph, or diffusion, and further absorption, distribution, metabolism or excretion (ADME) processes are described by mathematical equations whose structure is governed by physiology (*e.g.*, blood flow in exit of gut goes to liver, *etc.*) [16, 17]. As such, PBPK modeling is an integrated approach to understand and predict the pharmacokinetic behavior of chemical substances in the body.

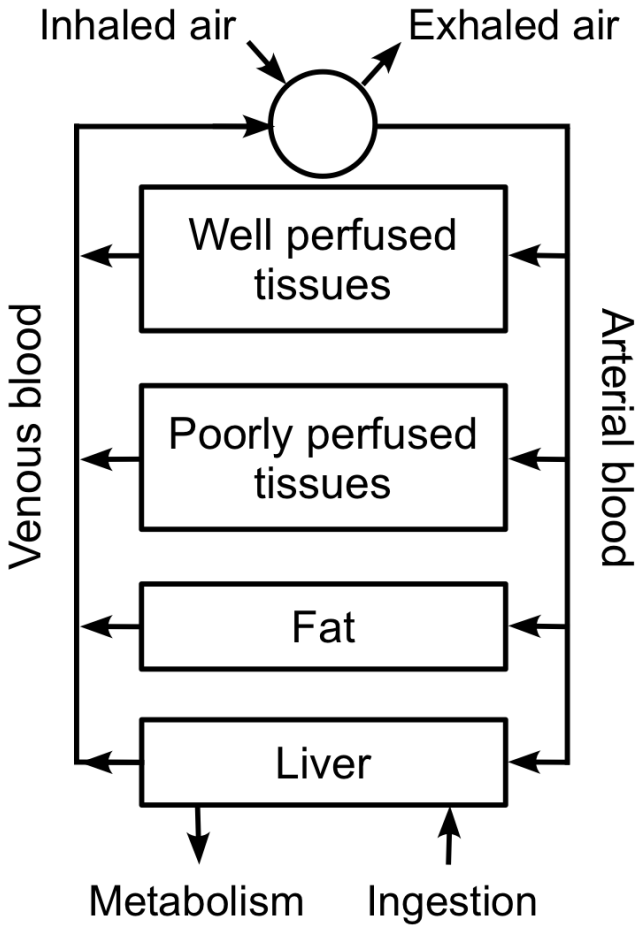


Figure 1: Schematic representation of a simple, perfusion limited, PBPK model. The model equations are detailed in the text.

Drug distribution into a tissue can be rate-limited by either perfusion or permeability. Perfusion-rate-limited kinetics apply when the tissue membranes present no barrier to diffusion. Blood flow, assuming that the drug is transported mainly by blood, as is often the case, is then the limiting factor to distribution in the various cells of the body. That is usually true for small lipophilic drugs. A simple perfusion-limited PBPK model is depicted on Figure 1. It includes the liver, well perfused tissues (lumping brain, kidneys and other viscera), poorly perfused tissues (muscles and skin) and fat. The organs have been grouped into those compartments under criteria of blood perfusion rate and lipid content. Under such criteria, the liver should be lumped with the well-perfused tissues, but is left separate here as it is supposed to be the site of metabolism, a target effect site and a port of entry for oral absorption (assuming that the gut is a passive absorption site which feeds into the liver *via* the portal vein). Bone can be excluded from the model if the substance of interest does not distribute to it. The substance is brought to each of these compartments *via* arterial blood. Under perfusion limitation, the instantaneous rate of entry for the quantity of drug in a compartment is simply equal to the (blood) volumetric flow rate through the organ times the incoming blood concentration. At the organ exit, the substance's venous blood concentration is assumed to be in equilibrium with the compartment concentration, with an equilibrium ratio named "partition coefficient" or "affinity constant" [17]. The kinetics of compound in the poorly-perfused compartment can therefore be described by the following differential equation:

$$\frac{\partial Q_{pp}}{\partial t} = F_{pp}\left(C_{art} - \frac{Q_{pp}}{P_{pp} V_{pp}}\right) \tag{1}$$

where Q_{pp} is the quantity of substance at any given time in the poorly-perfused compartment, F_{pp} the blood volumetric flow rate through that group of organs, C_{art} the substance's arterial blood concentration, P_{pp} the poorly-perfused tissues over blood partition coefficient and V_{pp} the volume of the poorly-perfused compartment. The tissue over blood partition coefficient P_{pp} measures the realtive affinity of the substance for the tissue compared to blood. It is easy to check that, at equilibrium,

$$\frac{\partial Q_{pp}}{\partial t} = 0 \;\Rightarrow\; C_{art} - \frac{Q_{pp}}{P_{pp} V_{pp}} = 0 \;\Rightarrow\; P_{pp} = \frac{C_{pp}}{C_{art}} \tag{2}$$

if we denote by C_{pp} the concentration of the substance in the poorly-perfused compartment.

Similarly, for the well-perfused and the fat compartments we can write, respectively:

$$\frac{\partial Q_{wp}}{\partial t} = F_{wp}\left(C_{art} - \frac{Q_{wp}}{P_{wp} V_{wp}}\right) \tag{3}$$

$$\frac{\partial Q_{fat}}{\partial t} = F_{fat}\left(C_{art} - \frac{Q_{fat}}{P_{fat} V_{fat}}\right) \tag{4}$$

The equation for the liver is a bit more complex, with a term for metabolic clearance, with first-order rate constant k_{met}, and a term corresponding to the oral ingestion rate of the compound, R_{ing} (which corresponds to the administration rate if gut absorption is complete, or to a fraction of it otherwise):

$$\frac{\partial Q_{liv}}{\partial t} = F_{liv}\left(C_{art} - \frac{Q_{liv}}{P_{liv} V_{liv}}\right) - k_{met} Q_{liv} + R_{ing} \tag{5}$$

Obviously, this is a minimal model for metabolism, and much more complex terms may be used for saturable metabolism, multiple enzymes, metabolic interactions, extra-hepatic metabolism *etc*. If the substance is volatile, and if accumulation in the lung tissue itself is neglected, the arterial blood concentration C_{art} can be computed as follows, assuming instantaneous equilibrium between blood and air in the lung:

$$C_{art} = \frac{F_{pul}\left(1 - r_{ds}\right) C_{inh} + F_{tot} C_{ven}}{F_{pul}\left(1 - r_{ds}\right) / P_a + F_{tot}} \tag{6}$$

where F_{tot} is the blood flow to the lung, F_{pul} the pulmonary ventilation rate, r_{ds} the fraction of dead space (upper airways volume unavailable for blood-air exchange) in the lung, and P_a the blood over air partition coefficient. Equation 6 can be derived from a simple balance of mass exchanges between blood and air under equilibrium conditions. C_{ven} is the concentration of compound in venous blood and can be obtained as the sum of compound concentrations in venous blood at the organ exits weighted by corresponding blood flows:

$$C_{ven} = \frac{\sum_{x \in [pp,wp,fat,liv]} \left(\frac{F_x Q_x}{P_x V_x} \right)}{F_{pp} + F_{wp} + F_{fat} + F_{liv}} \tag{7}$$

Finally, the substance's concentration in exhaled air, C_{exh}, can be obtained under the same equilibrium conditions as eq. 6:

$$C_{exh} = (1 - r_{ds}) \frac{C_{art}}{P_a} + r_{ds} C_{inh} \tag{8}$$

The previous equations assume that all of the substance present in blood is available for exchange with tissues. This may not be true if a fraction of the substance is bound, for example to proteins, in blood or tissues. In that case it is often assumed that binding/unbinding is rapid compared to the other processes. The equations are then written in term of unbound quantities and the rapid equilibrium assumption is used to keep track of the balance bound/unbound quantity in each organ or tissue [17].

Diffusion across vascular barriers or cellular membranes can be slower than perfusion. This condition is likely to be met by large polar molecules. In that case, to account for diffusion limitation, a vascular sub-compartment is usually added to each organ or tissue of interest. Diffusion between that vascular sub-compartment and the rest of the tissue is modeled using Fick's law. A diffusion barrier can also exist between the extra-cellular and intra-cellular milieus. Consequently, PBPK models exhibit very different degrees of complexity, depending on the number of compartments used and their eventual subdivisions [18].

2.2. Parameters values and variability

The next step after writing the model equations is to assign values to its many parameters. A PBPK model needs a considerable amount of information. At the system level we find substance-independent anatomical (*e.g.*, organ volume), physiological (*e.g.,* cardiac output) and some biochemical parameters (*e.g.*, enzyme concentrations). All those are generic, in the sense that they do not depend on the substance(s) of interest, and are relatively well documented in humans and laboratory animals [16, 19-24]. They can be assigned once for ever, at least in first approximation, for an "average" individual in a given species at a given time.

There are also, inevitably, substance-specific parameters which reflect the specific interactions between the body and the substance of interest. In many cases, values for those parameters are not readily available. However, such parameters often depend, at least in part, on the physico-chemical

characteristics of molecule studied (*e.g.*, partition coefficients depend on lipophilicity, passive renal clearance depends on molecular weight). In that case, they can be estimated, for example by quantitative structure-activity relationships (QSARs) [25, 26], also referred to as quantitative structure-property relationships (QSPRs) when "simple" parameter values are predicted. Molecular simulations (quantum chemistry) models can also be used [27, 28], in particular for the difficult problem of metabolic parameters' estimation. QSARs are statistical models (often a regression) relating one or more parameters describing chemical structure (predictors) to a quantitative measure of a property or activity (here a parameter value in a PBPK model) [29-34]. However, when predictive structure-property models are not available (as is often the case with metabolism, for example) the parameters have to be measured *in vitro* (for an extensive review see [35]) or estimated from *in vivo* experiments and are much more difficult to obtain.

In addition, using "average" parameter values does not correctly reflect the range of responses expected in a human population, nor the uncertainty about the value obtained by QSARs, *in vitro* experiments or *in vivo* estimation [36]. Inter-individual variability in PK can have direct consequences on efficacy and toxicity, especially for substances with a narrow therapeutic window. Therefore, simulation of inter-individual variability should be an integral part of the prediction of PK in humans. The mechanistic framework of PBPK models provides the capacity of predicting inter-individual variability in PK when the required information is adequately incorporated. To that effect, two modeling strategies have been developed in parallel: The first approach has been mostly used for data-rich substances. It couples a pharmacokinetic model to describe time-series measurements at the individual level and a multilevel (random effect) statistical model to extract a posteriori estimates of variability from a group of subjects [37]. In a Bayesian context, a PBPK model can be used at the individual level, and allows easy inclusion of many subject-specific covariates [38]. The second approach also takes advantage of the predictive capacity of PBPK models but simply assigns *a priori* distributions to the model parameters (*e.g.*, metabolic parameters, blood flows, organ volumes) and forms distributions of model predictions by Monte Carlo simulations [39].

2.3. Solving the model equations

Given the complexity of PBPK models and the need for flexible dosing inputs or time-varying parameters, numerical integration is required and algorithms for "stiff" systems are usually the best for that purpose [40]. A non-exhaustive list of software programs which allow PBPK modeling is given in Table 1. Some software programs are dedicated to PBPK modeling and propose preset values or distributions for their parameters. More general modeling software programs allow the definition of arbitrary systems of differential equations, but the user is left with the task of finding parameter values. Others are best suited to particular kinds of computation (*e.g.*, GNU MCSim for Bayesian population PBPK modeling [41]). The extent to which they can be used for PBPK modeling may be limited by the interface, the calculation speed and the flexibility of the modeling language [42].

Table 1: Major software resources available for PBPK modeling.

Name	Provider	Web site
Dedicated software		
BioDMET	General Electric	pdsl.research.ge.com/BioDMET
Cloe Predict	Cyprotex Ltd.	www.cyprotex.com/cloepredict

GastroPlus	Simulations Plus Inc.	www.simulations-plus.com
Maxsim2	Fraunhofer-Chalmers Centre	www.maxsim2.com
PK-Sim	Bayer Technology Services	www.systems-biology.com
PKQuest	Dr. David Levitt, U. Minnesota, USA	www.pkquest.com
Simcyp Simulator	Simcyp Ltd.	www.simcyp.com
General software		
ADAPT 5	Biomedical Simulations Resource, USC	bmsr.usc.edu
ACSLX	The AEgis Technologies Group Inc.	www.acslx.com
Berkeley Madonna	University of California at Berkeley	www.berkeleymadonna.com
GNU MCSim	Free Software Foundation	www.gnu.org/software/mcsim
GNU Octave	University of Wisconsin	www.octave.org
MATLAB	The MathWorks Inc.	www.mathworks.com
MLAB	Civilized Software Inc.	www.civilized.com
ModelMaker	ModelKinetix	www.modelkinetix.com
NONMEM	ICON	www.icondevsolutions.com
PhysioLab	Entelos Inc.	www.entelos.com
R (deSolve package)	The R Foundation for Statistical Computing	www.r-project.org
SAAM II	University of Washington	depts.washington.edu/saam2
WinNonlin	Pharsight	www.pharsight.com

3. Examples of PBPK Models

3.1. PBPK modeling for Cyclosporine A

We show here the application of a generic PBPK model (proposed by Simcyp Ltd) to the study of cyclosporine A (CsA) PK in humans, with the aim to reproduce the kinetics observed by Gupta et al. [43] and extrapolate it to a wider population. The structure of the PBPK model developed by Simcyp® for humans (and rats) is shown in Figure 2. The model structure is the same for both species, but parameter values differ between species, obviously. The administration routes common to both species are intravenous injection ("IV dose" on the figure) or the oral route ("PO dose" on the figure). The dermal and inhalation routes are also described for humans, but were not used for the CsA simulations presented here. Drug metabolism is supposed to take place only in the gut and liver, and the kidney is the only site of excretion. Numerically solving the corresponding set of differential equations yields the time-course of the quantity or concentration of a given drug in any of the organs or tissues included in the model.

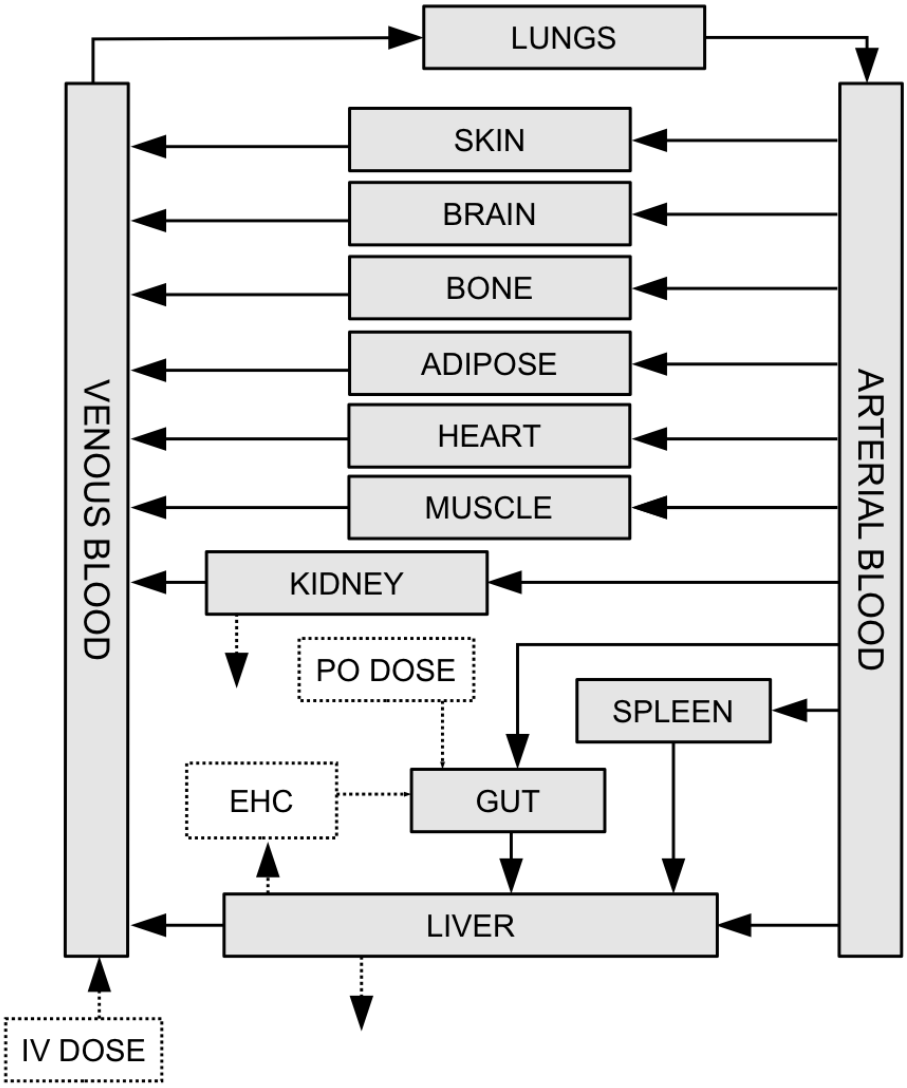


Figure 2: Schematic representation of the Simcyp® PBPK model structure for both humans and rats. "IV dose" represents intra-venous injection, "PO dose" *per os* administration, and "EHC" entero-hepatic cycling, respectively. The model application to cyclosporine A pharmacokinetics is described in the text.

The model structure is already coded in the Simcyp® software and only parameters are left to determine. We used the predefined “healthy volunteers” population. However, to match the characteristics of the subjects studied by Gupta et al. [43], the reference body mass of the subjects was set to an average of 64 kg, with age ranging from 24 to 34 years, with 50% males. Monte Carlo simulations were performed here to describe inter-individual variability only to a limited extent. The duration of the simulated study was 24 h after an oral administration of 10 mg/kg of CsA. A first-order oral absorption model was used, with a rate constant of 0.91 h^{-1} [44]. These parameter adjustments are easy to implement through a graphical user interface.

Figure 3 shows the data [43], superimposed with the average model prediction and the 5th and 95th percentiles of the simulated values. The time-course of CsA concentration in human blood is

reasonably well described, even though diet has obviously an effect on the absorption of the drug. More detailed simulations of the gastric absorption process would be possible. However, for our predictive purposes (extrapolating *in vitro* toxicity data to *in vivo* conditions) we did not need a refined model. We still wanted to capture the range of responses expected in a larger population. Figure 4 illustrates which is probably one of the most interesting capacity of PBPK modeling: predicting the concentration time-course of a substance (CsA in this case) in different organs (here in the brain, liver and kidney) for a human population. One hundred healthy subjects were simulated, aged from 20 to 70 years, taking a daily dose of 10 mg/kg of CsA for 60 days. The other parameters were sampled from the same distributions than those used for Figure 3. Note that during the first week of treatment, liver exposure is the highest of the three, but brain exposure after 60 days is higher than liver or kidney exposure. A more precise simulation of CsA concentration time-course in the kidney, now split into extracellular and intracellular spaces, is presented in Figure 5. Note that although the total kidney concentration appeared at (dynamic) equilibrium at 60 days, the intracellular concentration is in fact not exactly at equilibrium yet at that time and is much higher than in plasma or extracellular space (CsA is very lipophilic and accumulates in cells). The intracellular concentrations predicted can now be related to a dose-response model developed on the basis of *in vitro* measured intracellular concentrations and effects.

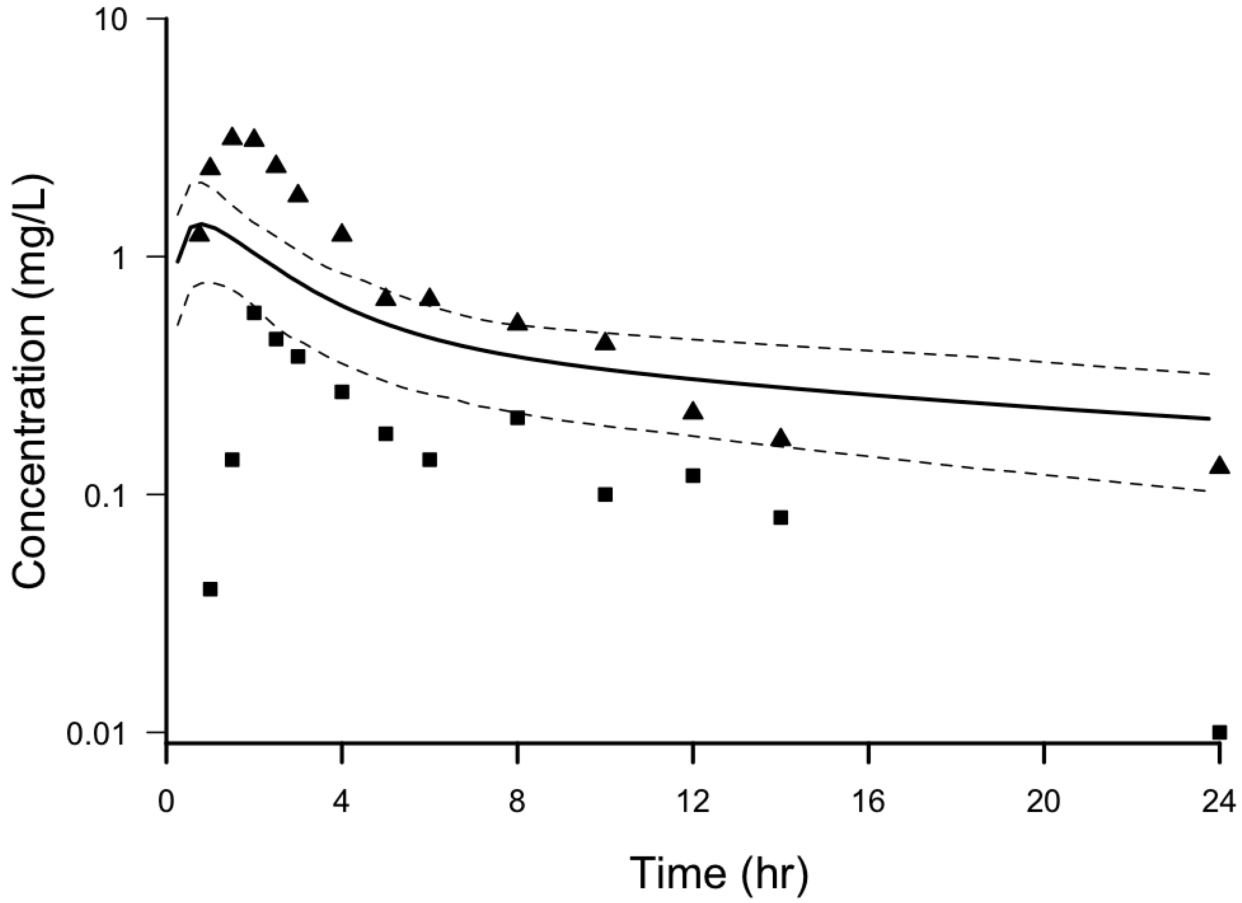


Figure 3: Modeled and observed cyclosporine A pharmacokinetics in human blood. The data of Gupta et al. [43], obtained after oral administration of 10 mg/kg of cyclosporine A to a healthy volunteer, are represented by either squares (low fat diet conditions) or triangles (high fat diet). The thick solid line represents the corresponding average model predictions for 100 similar subjects (diet not considered). The thin lines indicate the 5th and 95th percentiles of the 100 simulated values.

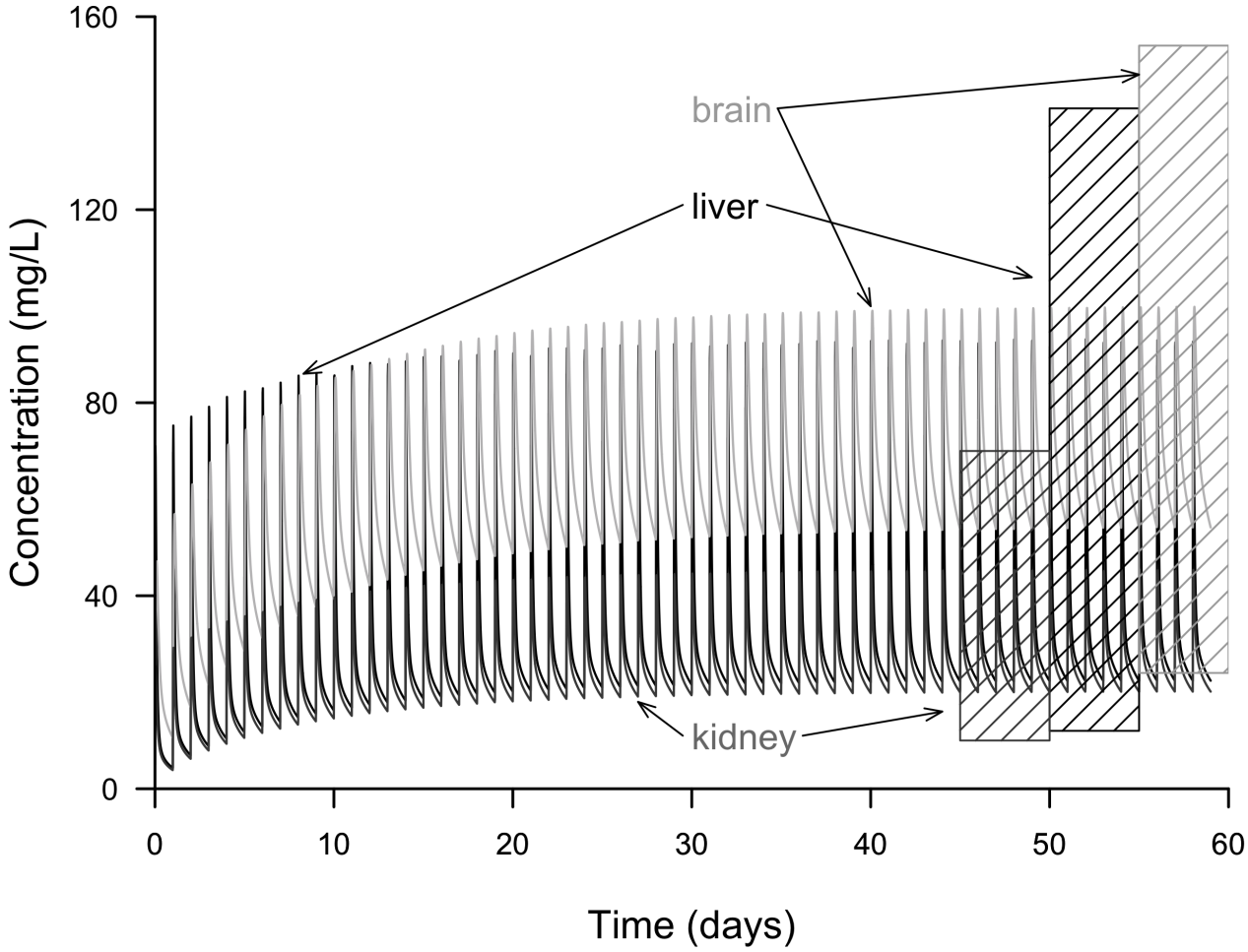


Figure 4: Predictions of long-term cyclosporine A pharmacokinetics in humans. Time course of cyclosporine A concentrations predicted in the brain, liver and kidney of healthy subjects, aged from 20 to 70 years, and taking a daily dose of 10 mg/kg of cyclosporine A. The lines represent the average concentrations at any time for 100 simulated subjects. The bars at the right indicate the range (from 5th to 95th percentiles) of concentrations found in the organs after 60 days of treatment.

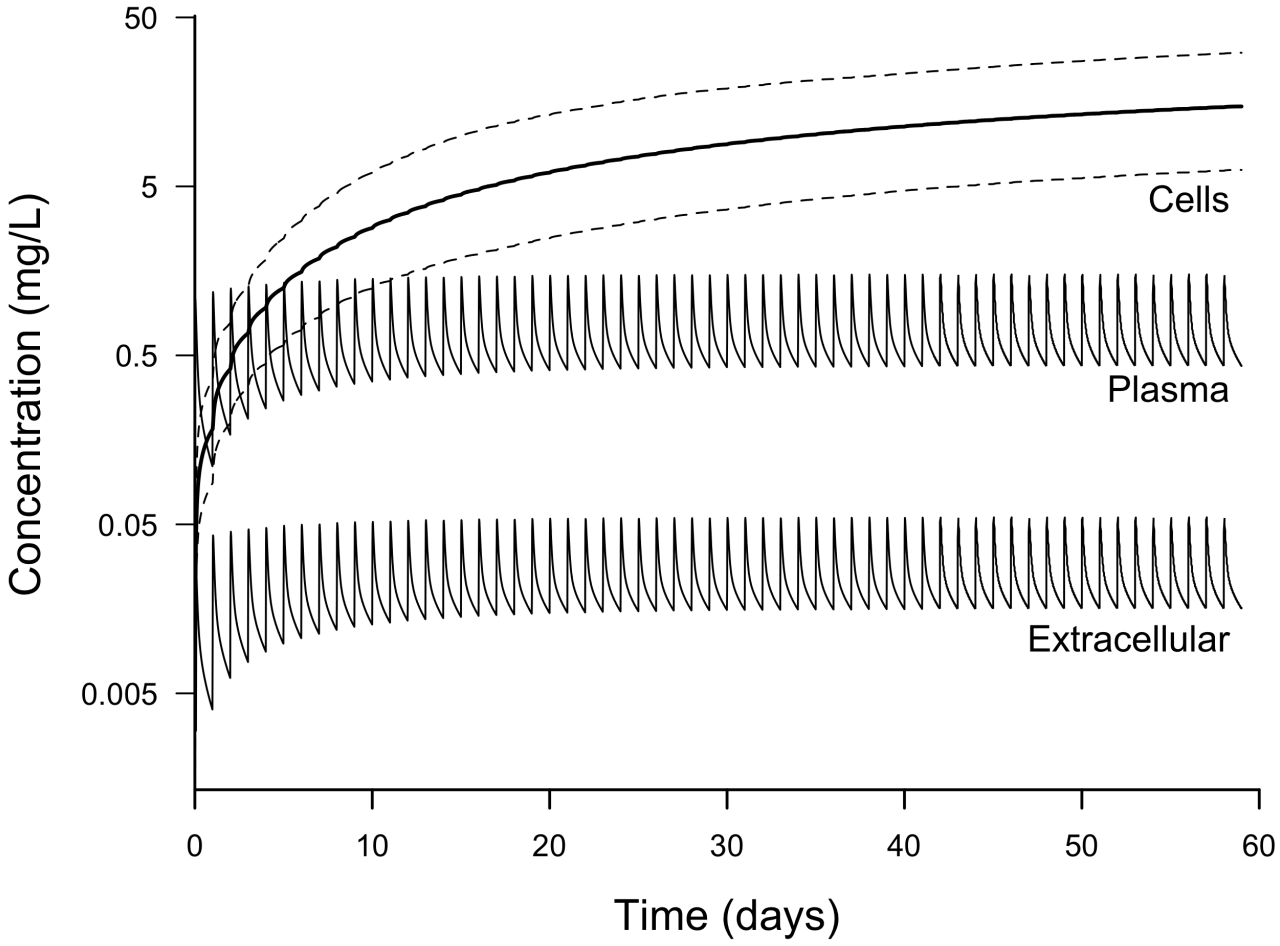


Figure 5: Predictions of long-term cyclosporine A concentrations versus time course in sub-compartments of the human kidney. One hundred healthy subjects, from 20 to 70 years old, taking a daily dose of 10 mg/kg of cyclosporine A were simulated. For plasma and extracellular concentrations, the line gives the mean predicted value. For intracellular concentration, the mean, 5th and 95th percentiles are given.

3.2. PBPK modeling for metals and inorganic compounds: example of nanoparticles

The safety of nanoparticles is of major importance and there is still much uncertainty about their toxicity. The issue is controversial: though nanotechnology is thriving, the safety data is scarce and contradictory, even for the same type of nanoparticles [45]. PBPK models have been very successfully applied to study the ADME of small molecules, but nanoparticles are relatively large objects compared to molecules and it is unclear to what extent the models need to be profoundly altered to describe the kinetics of nanoparticles in the body. We show here that they can offer a preliminary assessment, or first approximation to that question.

Péry et al. [46] developed a PBPK model for ^{99m}technetium-labelled carbon nanoparticles (Technegas®) (Figure 6). It was designed to analyze gamma-ray imaging data from an experiment which assessed the fate of those nanoparticles after the inhalation of Technegas® by 5 healthy

volunteers [47]. Tissue radioactivity estimates were derived from the light intensity of predefined regions of interest ("lung", "liver", "stomach lumen", "bladder") (Figures 7 and 8). Radioactivity was also directly measured in blood. The conclusion of Nemmar *et al*. [47] was that nanoparticles are able to translocate from the lungs and disperse in the body, but Mills *et al.* [48] challenged that conclusion, pointing out that free technetium (Tc) may have leached out of the carbon nanoparticles. To help resolve the issue Péry *et al.* PBPK model proposed a realistic, even if simplified, description of the absorption, distribution and elimination of Technegas® nanoparticles. It can be used to simulate the time course of radioactivity associated with ^{99m}Tc-labelled nanoparticles and free ^{99m}Tc in the various body compartments, as a function of the Tc amount inhaled and of physiological parameters. In the model, the body is split into 24 blood-flow limited compartments and the intake of nanoparticles occurs through breathing. Most of them go into the lungs while a small part goes to the stomach after being swallowed. Passive lung clearance of particles by the mucociliary system also transports them to the stomach. Three Technegas® fractions were considered: ^{99m}Tc bound to large particles (unable to translocate), ^{99m}Tc bound to small particles and free ^{99m}Tc (both able to translocate). Once in the blood, small particles and free ^{99m}Tc diffuse to various compartments. Elimination of the free Tc was supposed to occur by renal filtration to urine.

To calibrate the model parameters on the basis of the data, given the strong inter-individual variability observed (Figure 7), a hierarchical population PK model [38, 49] was used. Basically, a model was fitted to each subject's data, with statistical constraints on the average and variance of the parameter values across subjects. A Bayesian statistical framework was used to update the prior knowledge available on physiological parameters on the basis of the information conveyed by the data. Markov chain Monte Carlo simulations were performed to obtain posterior distributions of the model parameters [50].

The results obtained are shown in Figure 7 and 8. The predictions fit the experimental data reasonably well. The calibrated model gives access to critical parameters, hard to observe directly, such as the proportion of free Tc (6,7%), the proportion of nanoparticles able to reach blood circulation (12,7%) and the actual exposure dose (139-229 MBq). The coefficient of variation of the proportion of free Tc or particles able to reach blood circulation was less than 20%: despite the small number of subjects, the model gives a rather precise estimate of those parameters. Those results are consistent with previous studies [48, 51, 52]. An alternative model was tried, in which nanoparticles were not allowed to translocate to blood. But that model did not fit at all the data, and that lead to the conclusion that some nanoparticles must translocate from lungs to blood circulation, which supports the conclusion of Nemmar et al. [47]. This type of conclusions would have been hard to reach without PBPK modeling.

To study how nanoparticles physicochemical properties influence their distribution, Li et al. [53] compared blood-flow limited and membrane diffusion limited PBPK models for poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles with various monomethoxypoly(ethyleneglycol) (mPEG) contents (PLGA, PLGA-mPEG256, PLGA-mPEG153, PLGA-mPEG51, PLGA-mPEG34). The models were fitted to experimental data on mass *vs.* time profiles of the nanoparticles in mouse tissues following intravenous administration. The first conclusion of the authors is that the diffusion limited performed better than the blood-flow limited model. That may explain Lee's et al. [54] limited success with flow-limited model for quantum dots QD705, except for the bare PLGA nanoparticles, for which both models were adequate. For the former model, multivariate linear regression analysis was performed to establish the relationship between nanoparticles properties (size, zeta potential and number of particles per unit surface area) and biodistribution parameters. The regression worked well to predict the biodistribution of another formulation (PLGA-mPEG495). Similar predictivity was found for charge and size in the case of gold/dendrimer

composite nanoparticles [55]. Reviews by Yang et al. [56] and Li et al. [57] confirmed that PBPK models adequately fit and simulate experimental data and may be used efficiently for nanoparticles design, development and optimization in medical applications or safety evaluation.

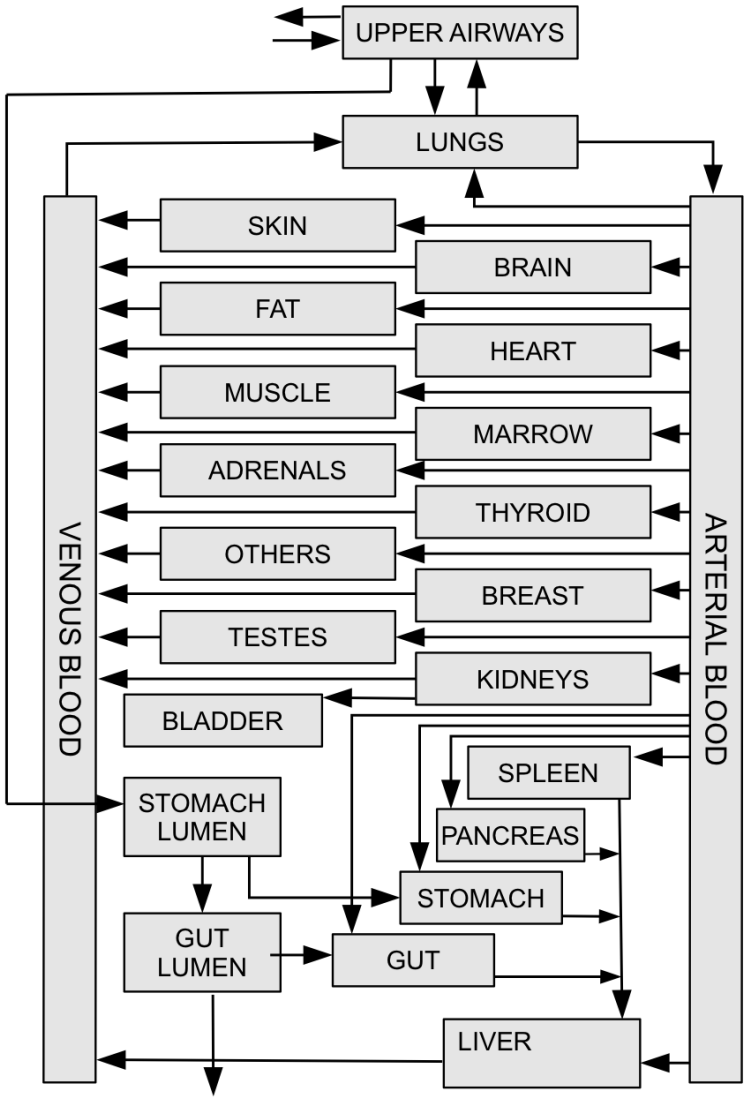


Figure 6: Schematic representation of the PBPK models used to describe the kinetics of ^{99m}technetium-labelled carbon nanoparticles (Technegas®) in a human male [46]. The body is subdivided into compartments describing organs or diffuse tissues. Technegas® nanoparticles or free technetium are transported by blood or diffuse through the compartments.

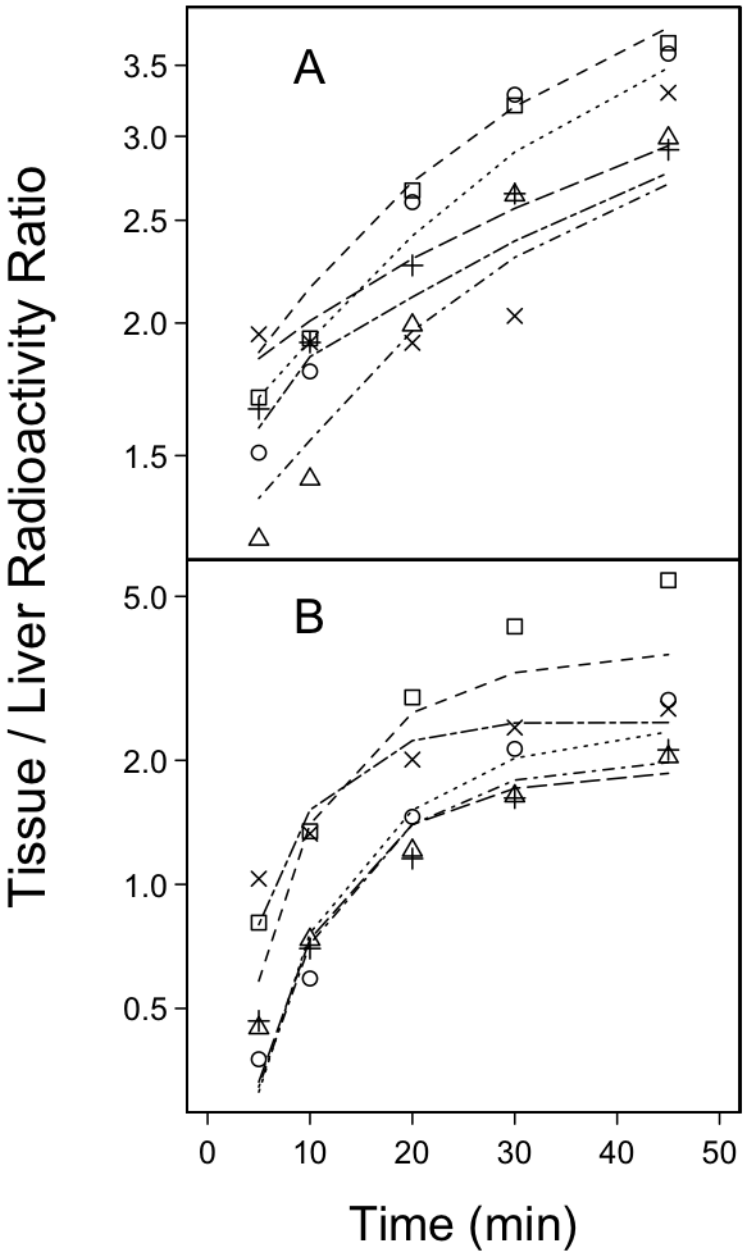


Figure 7: Time course of radioactivity in the stomach lumen (A) and urine (B) of five human subjects after inhalation of ^{99m}technetium-labelled carbon nanoparticles [46, 47]. Radioactivity estimates are expressed as ratios of liver radioactivity (squares and dashes: subject 1; circles and fine dashes: subject 2; triangles and dot dashes: subject 3; plus signs and long dashes: subject 4; crosses and mixed dashes: subject 5). Adapted from [46].

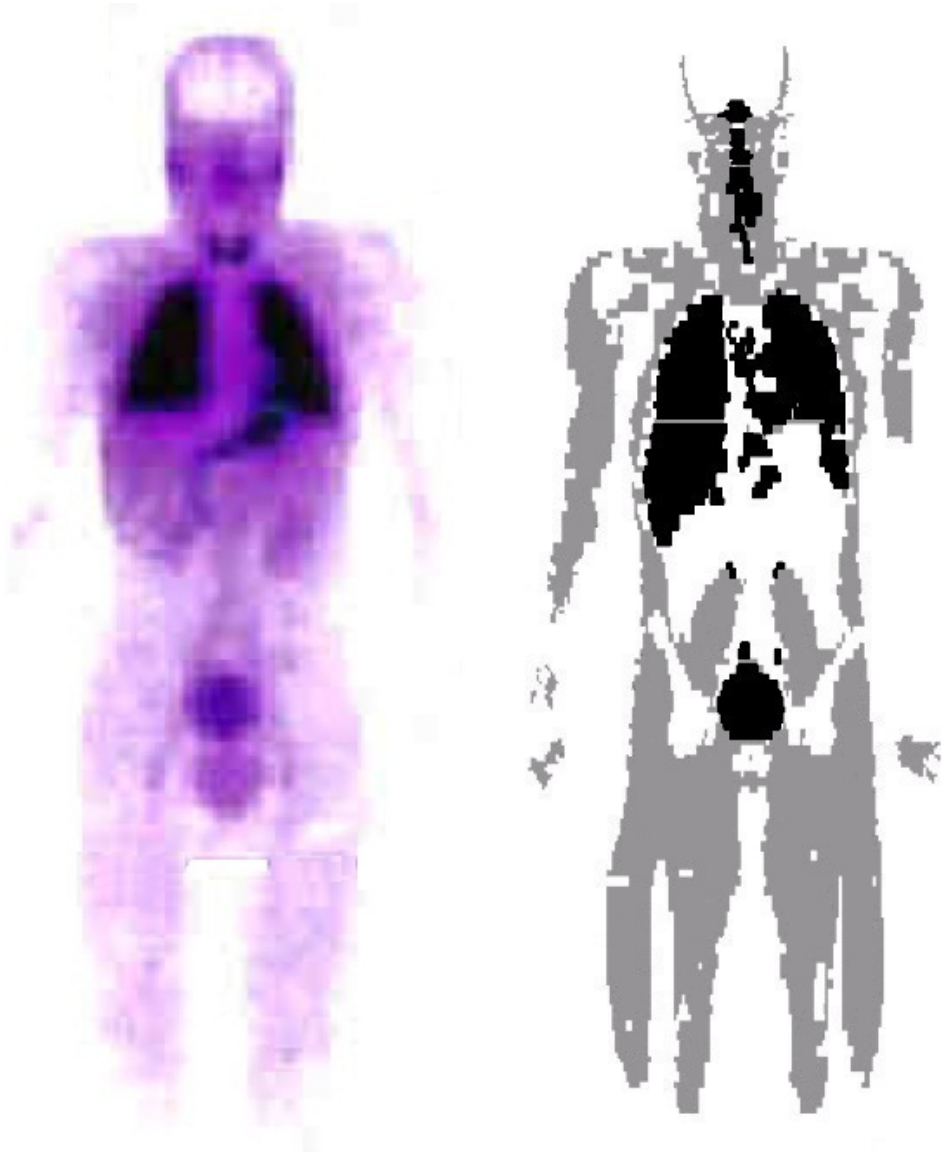


Figure 8: Whole body imaging of ^{99m}technetium gamma emission 60 minutes after inhalation of ^{99m}technetium-labelled carbon nanoparticles by a human volunteer [47]. The recorded image is on the left panel. The right panel shows a PBPK-predicted reconstruction of internal exposure at the same time. Adapted from [46].

4. Major Uses of PBPK Modeling

PBPK models have received well-described applications in various types of extrapolation, prediction of bioavailability, investigational pharmacology, first dose finding, treatment tailoring, prediction of drug-drug interactions and dose reconstruction. Those applications are briefly reviewed here.

4.1. "Basic" extrapolations

Since they are based on mechanistic descriptions of ADME, PBPK models have a much extended domain of validity compared to empirical (data fitted) compartmental models. As long as the basic phenomena accounted for by a PBPK model are appropriately described, it can safely perform various types of extrapolations: Between doses, dosing schedules, routes of administration and in particular between animal species, which is one of their original applications [58, 59]. A major current application is prediction of inter-individual and intra-individual variability drug PK.

The general principle of dose extrapolation is simply to predict the internal concentrations corresponding to different doses (*e.g.*, when changing dose-regimen). That usually requires some definition of the internal concentrations sought and is most often used in toxicity assessment. Dose extrapolation should not be confused with dose-finding (or dose reconstruction), in which the administered dose needed to obtain the same internal concentrations are sought (see the "dose reconstruction" section, below). Extrapolating dosing schedules (*e.g.*, from regular repeated dosing to irregular, time-varying dosing) is facilitated by the fact that no analytical derivations are sought for PBPK models and that numerical integration is the norm for such models. Numerical integrators can routinely handle arbitrary time-varying "input functions" (*e.g.*, in GNU MCSim) or "forcing functions" (*e.g.*, in the R deSolve package) and predicting the impact of complex schedules on internal concentrations is routine. Similarly, as long as the various routes of administration of interest are described in the model, the same model can be used to predict internal concentrations after any of those routes, taking into account first-pass metabolism when needed [60].

Inter-species and inter-individual extrapolations are also conceptually simple: it is enough to change the model parameters to reflect different species or individuals. For anatomical or physiological parameters that is relatively easy to do since databases of average parameter values, or even statistical distributions, have been collected on major laboratory animal species and humans [10, 20-23, 61]. Such databases constitute most of the added value of software such as PK-Sim® or Simcyp®. The difficulty remains to assign parameters for metabolism and other substance-dependent parameters. In that case, it is possible to use *in vitro* parameter estimates (*e.g.*, for V_{max} and K_m for a specific enzyme) [62, 63], or in last recourse allometric relationships (which relate metabolic parameters and body size) [64, 65].

4.2. Fast-throughput predictions of key PK characteristics

PBPK models can make systemic predictions of key parameters for lead optimization: Bioavailability, distribution volume and clearance which characterize absorption, distribution and elimination, respectively [66-69]. Prediction of bioavailability has been a focus for research and an example of success, as it was once a bottleneck in drug development. Bioavailability, the fraction of administered dose which reaches the venous circulation, may be dose-dependent and is definitely exposure route-dependent [70]. Except for the intra-venous route, a xenobiotic passes through one or several organs (stomach, gut, liver, skin and lung) before reaching the general circulation and ultimately its target(s). Bioavailability depends in complex ways on the composition, physical processes of transport and dissolution, presence of metabolizing enzymes, transporters, *etc*. in those organs [71]. So far, PBPK modeling has proved itself the best way to quickly predict bioavailability in humans [72, 73]. Other parameters can be similarly estimated [15].

4.3. Understanding the pharmacokinetics of the active drug

PBPK modeling, by forcing an explicit thinking about the most important determinants of ADME for a given substance, usually leads to a better understanding of the PK of a drug candidate *in vivo*. By the same token, it can help in selecting experiments and designs for a more efficient project support quote [74]. There are also cases where the active or toxicity-causing substance is not the parent drug. Understanding the relationships between administered dose and effects, in order to better control dosing, is obviously more difficult in that case and can benefit from modeling. The study of active metabolites is linked to the study of prodrugs, and requires much more work than for a single active drug. Indeed, in that case it is necessary to understand and model the parent compound and metabolites PK, because perturbations of the prodrug ADME will have direct effects on the active metabolite. For example, the input phase of the active metabolite is not a simple absorption and depends on the ADME of the prodrug. The problem can be complex and PBPK modeling may be very helpful in that case [75]. Moreover, the parent compound and its active metabolite(s) are present in the body at the same time, and PBPK modeling is an efficient way to model their possible interactions (see below on interactions modeling).

4.4. Finding the first dose in humans

During the R&D process of a drug, phase I of clinical development is probably the most apprehended: it is at that time that the drug in development is first administered to human. Obviously, the dose cannot be chosen haphazardly. Too large a dose can be toxic for the study subjects, too low the dose can lead to the inclusion of too many subjects in the study and wrong conclusions about efficacy [15]. This is where PBPK based inter-species extrapolation of the therapeutic window, eventually complemented with quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation, finds an important application [59]. PBPK models give as good or better predictions than allometric approaches, especially when several populations are used in phase I studies [70], or for specific populations such as children [76]. In that case, inter-individual extrapolation is also performed (*i.e.*, going from a rather homogeneous animal population to a heterogeneous human group) [77].

4.5. Helping individualize treatments

This is currently a major application of PBPK modeling [78, 79]. Individuals vary according to their anatomy, physiology, metabolism, genetic make-up *etc*. Particular individuals can be modeled separately with parameter values corresponding to their characteristics [80]. Whole populations, or clinical trial groups, can also be simulated by generating random individuals using Monte Carlo simulations [39]. In that case, variability is captured as statistical distributions of the model parameters. Such a variability analysis can be coupled to a sensitivity analysis to understand the physiological determinants of potential under- or over-dosing [81]. Individualization can target specific sub-populations such as children [82, 83], patients with liver cirrhosis [84], surgical patients [85], populations of different ethnic backgrounds [71] *etc*. It could also target individual patients through Bayesian updating [86], in the context of a population PK approach [38, 39, 49, 87]. The range of applications is wide open: An interesting example is drug dosing in interstellar space for (yet small) populations of astronauts [88].

4.6. Help predict metabolic interactions in co-treatments

Predicting pharmacokinetic and pharmacodynamic drug-drug interactions (DDI), and more generally interactions between drugs, food-borne substances and environmental or occupational contaminants is a challenge for drug safety assesment [89, 90]. Possibilities for effect potentiation also drive the search for combination therapies. The first application of a PBPK model to address that problem at the pharmacokinetic level took warfarin and bromosulfophtalein as an example [91, 92]. Several applications for environmental chemicals were developed later [93, 94]. The approach to DDI prediction by PBPK modeling is straightforward: The same model is used to describe the concurrent kinetics of two or more substances after concomitant administration. This requires at least twice as many differential equations as in a single-chemical model. Interactions translate into some differential equations depending on (local) concentrations of several substances, for example in terms accounting for inhibition of the metabolism of one substance by the other(s) [95]. Other types of interactions, through competition at the absorption site, for plasma protein binding, or transporters can be modeled [96]. That has nowadays become an important application of PBPK models in the pharmaceutical industry [71, 97-99]. An extension of this approach to many (say, 50 or 100) substances has been demonstrated recently, but that is still a research topic [90, 100].

4.7. Dose reconstruction

The question of dose-reconstruction may be more relevant for environmental toxicology and epidemiology than for pharmacology. However, that is an interesting inverse problem: Knowing a substance or metabolite concentration in some organ(s), or their quantity excreted per unit time, the challenge is to find the input doses. If bolus dosing can be assumed, this can be reduced to finding the initial conditions of the system [101, 102]. Those initial conditions can be treated as unknown parameters to estimate with appropriate statistical techniques [103]. Reconstructing multiple and variable dosing is much more challenging, since a whole input function has to be reconstructed [104]. In addition, the data may come from human biomonitoring studies, in which in there are very few samples per subject [32, 105-107]. Obviously, in such difficult problems, physiological knowledge on parameter values should be used to a maximal extent and Bayesian statistical techniques are particularly suitable for that purpose [38, 103].

5. Open Issues and Perspectives

The PBPK models currently used are perfectible in many ways. The trend is to refine them to more closely simulate the fate of molecules in the body. However, those refinements are kept generic to simplify their application to the largest possible number of substances. An overview of the most important of those developments is presented here.

5.1. Lifetime PBPK models

Most of the PBPK models developed in the past corresponded to adult humans, with time-independent parameter values. However, even if from the age of 20 to approximately 60 the human body does not change much (with notable exceptions of disease, pregnancy, accidents), the early

and late parts of life witness important changes. A current trend, which may be more obvious in environmental or occupational toxicity assessment, is to develop lifetime models for persistent drugs or toxicants [108, 109]. Such models can also be used to simulate populations of various ages in a unified framework [76]. It is important to realize that those models permit to understand the determinants of intra-individual variability, which is often lumped with inter-individual variability in population pharmacokinetics studies [39, 50].

During childhood, many physiological factors (*e.g.*, tissue volumes, blood flows, enzymatic equipment) vary continuously [20, 110, 111]. Those physiological changes can be modeled by replacing constant parameters by time-varying functions, which in turn may contain new constant parameters [83]. There are many ways to mathematically describe age-related changes and several equations have been proposed (Preece-Baines or von Bertalanffy equations, sigmoid or polynomial functions *etc*.) [112]. In any case, it is necessary to use flexible models since the types of changes with time can be very different [113].

Old age is also marked by important physiological and metabolic changes [114]. Together with the fact that many elderly people take multiple drugs, that leads to an increased risk of drug-drug interactions. Here also PBPK models can be useful as clinical prediction tools.

5.2. Altered physiological conditions

Another trend is to develop models (eventually included in a life-time framework) for complex physiological states. Such states may correspond to small populations or populations hard to recruit in clinical trials. An example is pregnancy, during which physiology is clearly modified, to the point that a PBPK model must alter its structure to describe the new compartments (placenta, fetus) being formed [23]. In addition to a correct modeling of the altered kinetics for the mother, adding the fetal compartments gives access to predictions of concentrations in the fetus itself. This may be important for some drugs [115] and is definitely useful for health risk assessment for chemicals in general [112, 116-121].

Nearly all altered physiological states can have an impact on drug disposition, at least locally, and if pathological, require therapeutic treatment [122, 123]. Understanding the effects of pathologies on drug kinetics, for target drugs or concurrent treatments, is highly relevant and PBPK models are a tool of choice for that purpose. Specific models have been developed for example for renal impairment [124], obesity [125, 126], and liver cirrhosis [84].

5.3. Organ-level improvements

Obviously, most PBPK models are crude approximations of the reality (those given as examples above do not escape that criticism). It is actually amazing that they work reasonably well at predicting drug kinetics. However, some complex pharmacokinetics phenomena are still difficult to model in both detail and generality. The problem is particularly acute for sensitive processes which largely condition the whole kinetic profile and delivery to the target. Most sensitivity analyses of PBPK models point to the importance of input and output processes [49, 127, 128]. That has naturally led to the development of refined models of oral absorption [36, 70, 79, 129-131], pulmonary absorption [132-134], dermal absorption [135-138], renal excretion [139, 140] and liver metabolism [141]. Such models are increasingly related to virtual organ models, ideally able to

describe anatomy, physiology, PK and PD at the organ level [142, 143]. Improved liver models, for example, at least account for zonation effects [144-146]. Metabolism, however, is not limited to the liver and entails more than just tissue structure. As such it is discussed in the next section.

5.4. Metabolism

Metabolism is often an important route of elimination and an component of PBPK models. As long as only the fate of the parent drug is concerned, a handful of primary metabolic reactions can be enough to consider, with linear or simple Michaelis-Menten kinetics [17]. Arguably, most PBPK models published so far have been very simplistic in that respect. That is clearly insufficient when effects or toxicity are due to metabolites, or when metabolic drug-drug interactions are investigated. In that case a more complete description of metabolism is desirable. However, the trend towards generic PBPK models, applicable with a minimal degree of redevelopment to any substance, is difficult to reconcile with detailed descriptions of metabolism. Some software programs provide a tunable collection of cytochrome P450 reactions in each compartment of the model [71]. But the full range of possibilities for metabolism is very complex and defies current generic models. In addition, *in silico* (QSAR *etc*.) predictions of metabolism and metabolic rate constants or *in vitro* testing are enormous tasks, given all the possible pathways to consider. That is where concepts of complexity "management" developed in systems biology [147] could help, but research in this area is still under development [90]. An advantage of systems biology modeling is that it can link seamlessly metabolism and toxicity pathways, opening the way to integrated PK/PD modeling [148].

5.5. Pharmacological feedback effects

Drugs, via their therapeutic or unwanted effects, may affect their own disposition. That leads to possible feedbacks of PD on PK. Target-induced disposition, which has been observed in the case of monoclonal antibody therapies or nanovectors, is a related problem [149, 150]. Given the potential complexity of the question, PBPK models are useful here to understand the respective roles of various factors and help control dosing, for example. A first example of such effects is enzymatic induction by the drug of interest [151]. This can reduce a drug efficacy over time if it induces its own metabolism [152], but it can also affect toxicity, including for chemicals such as dioxins [153]. Other ADME processes may be altered, such as protein binding, volume of distribution, active transport, renal excretion *etc*. For example, physiopathological changes (high cardiac output, increased glomerular filtration) combined to therapeutic interventions (*e.g.*, haemodynamically active drugs, mechanical ventilation, renal replacement therapy) in critically ill septic patients can lead to insufficient antibiotic concentrations and poor clinical outcomes [154]. In such cases, feedback effects are compounded with the drug-drug interaction problems and altered physiological states seen above in this chapter. Clear mechanistic descriptions, such as provided by physiological modeling, can help master such a complexity.

5.6. Coupling to imaging

As we have seen above (in the Technegas® example), PBPK modeling can usefully assist the analysis of tracer imaging data [155]. In that case, radioactivity was followed using a gamma ray

camera [46]. Other imaging techniques, such as magnetic resonance imaging, positron emission tomography (PET) molecular imaging, or quantum dots tracing, have been used in conjunction with PBPK modeling [56, 156-159]. On the other hand, imaging data can usefully inform PBPK modeling for given individuals by giving access to internal organ volumes, blood flows, substance concentration *etc*., way beyond the usual meager observations of blood, urine, or exhaled air concentrations. A challenge in image analysis (or imaging data fusion) with PBPK models is also to go beyond the simple analysis of "tissular" concentrations extracted from manually defined "regions of interest". The coupling of spatio-temporal statistical analyses and PBPK modeling is a challenging area, similar to brain functional magnetic resonance imaging [160], which deserves investigation.

5.7. Coupling to in vitro *"human on chip" assays*

The integration of *in vitro* testing and PBPK modeling is seen as a complement, or even as an alternative, to *in vivo* studies [35, 161]. We have seen above how individual PBPK processes and parameters can be informed by *in vitro* or QSAR results. PBPK models can then be used to purely predict *in vivo* internal concentrations at the organ or cell level. Such target concentrations can be plugged into dose-response or PD models derived from another set of *in vitro* toxicity assays to yield predictions of toxic effects.

Integration is also directly sought in "human on chip" microsystems. In such systems, various cell types are cultivated in different chambers of a microsystem. The chambers are connected by a network of microfluidic culture medium flows to mimic blood flow through organs [162-167]. Rather than an alternative to modeling, those efforts are actually opportunities for a better synergy between *in vitro* experiments and mathematical modeling: The microchips can, for example, provide information on the formation of secondary metabolites in a peripheral cell type after a first transformation of the parent molecule in cultured hepatocytes [168]. This would be difficult to assess at relevant time scales with separate cell cultures. Obviously, modeling of the microsystem itself is required if meaningful parameter estimates are to be extracted from it, and this is akin to PBPK modeling. Even in that case, PBPK modeling of the animal species (typically humans) targeted for extrapolation is useful to *i*. design the microchip, its flows and other operating characteristics and experimental protocols; *ii*. scale up the data obtained in microchips.

Conclusion

PBPK modeling is more and more used in research, development and regulation [169]. An analysis of recent submissions to the US FDA shows a sharp increase in the number of applications of PBPK in drug development [170]. Obviously, the precision and accuracy of PBPK model will be only as good as those of the QSAR predictions or *in vitro* data used to set their parameters. Quality assurance of those components is therefore an important issue [171, 172], and we have seen that in several areas (metabolism in particular), research work is still needed [169]. As to the models themselves, their validity will probably be easier to check if they are generic and with a stable and well-documented structure [173]. This requirement, however, runs somewhat contrary to the next challenge: Coupling PBTK models to predictive pharmacology or toxicity models, both at the cellular level and at the organ level [174].

References

1. Haggard, H. W. (1924) The absorption, distribution, and elimination of ethyl ether. I. The amount of ether absorbed in relation to the concentration inhaled and its fate in the body, Journal of Biological Chemistry 59, 737-751.
2. Haggard, H. W. (1924) The absorption, distribution, and elimination of ethyl ether. II. Analysis of the mechanism of absorption and elimination of such a gas or vapor as ethyl ether, Journal of Biological Chemistry 59, 753-770.
3. Haggard, H. W. (1924) The absorption, distribution, and elimination of ethyl ether. III. The relation of the concentration of ether, or any similar volatile substance, in the central nervous system to the concentration in the arterial blood, and the buffer action of the body, Journal of Biological Chemistry 59, 771-781.
4. Haggard, H. W. (1924) The absorption, distribution, and elimination of ethyl ether. IV. The anesthetic tension of ether and the physiological response to various concentrations, Journal of Biological Chemistry 59, 783-793.
5. Haggard, H. W. (1924) The absorption, distribution, and elimination of ethyl ether. V. The importance of the volume of breathing during the induction and termination of ether anesthesia, Journal of Biological Chemistry 59, 795-802.
6. Teorell, T. (1937) Kinetics of distribution of substances administered to the body, Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie 57, 205-240.
7. Gibaldi, M., and Perrier, D. (1982) Pharmacokinetics, Second Edition, revised and expanded ed., Marcel Dekker, New York.
8. Bischoff, K. B., Dedrick, R. L., Zaharko, D. S., and Longstreth, J. A. (1971) Methotrexate pharmacokinetics, Journal of Pharmaceutical Sciences 60, 1128-1133.
9. Dedrick, R. L., Forrester, D. D., Cannon, J. N., El Dareer, S. M., and Mellett, L. B. (1973) Pharmacokinetics of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (ARA-C) deamination in several species, Biochemical Pharmacology 22, 2405-2417.
10. Gerlowski, L. E., and Jain, R. K. (1983) Physiologically based pharmacokinetic modeling: principles and applications, Journal of Pharmaceutical Sciences 72, 1103-1127.
11. Droz, P. O., and Guillemin, M. P. (1983) Human styrene exposure - V. Development of a model for biological monitoring, International Archives of Occupational and Environmental Health 53, 19-36.
12. Lutz, R. J., Dedrick, R. L., Tuey, D., Sipes, G., Anderson, M. W., and Matthews, H. B. (1984) Comparison of the pharmacokinetics of several polychlorinated biphenyls in mouse, rat, dog, and monkey by means of a physiological pharmacokinetic model, Drug Metabolism and Disposition 12, 527-535.
13. Rowland, M., Peck, C., and Tucker, G. (2011) Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science, Annual Review of Pharmacology and Toxicology 51, 45-73.
14. Nestorov, I., Aarons, L., and Rowland, M. (1998) Quantitative structure-pharmacokinetics relationships: II. A mechanistically based model to evaluate the relationship between tissue distribution parameters and compound lipophilicity, Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics 26, 521-545.

15. Jones, H. M., Parrott, N., Jorga, K., and Lavé, T. (2006) A novel strategy for physiologically based predictions of human pharmacokinetics, Clinical Pharmacokinetics 45, 511-542.
16. Clewell, R. A., and Clewell, H. J. (2008) Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment, Regulatory Toxicology and Pharmacology 50, 129-143.
17. Campbell, J. L., Jr., Clewell, R. A., Gentry, P. R., Andersen, M. E., and Clewell, H. J., III. (2012) Physiologically based pharmacokinetic/toxicokinetic modeling, In Computational Toxicology, Methods in Molecular Biology Series (Reisfeld, B., and Mayeno, A. N., Eds.), pp 439-499, doi: 410.1007/1978-1001-62703-62050-62702_62718, Humana Press, New-York.
18. Thompson, M. D., and Beard, D. A. (2011) Development of appropriate equations for physiologically based pharmacokinetic modeling of permeability-limited and flow-limited transport, Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 38, 405-421.
19. International Commission on Radiological Protection (ICRP) (1975) Report of the Task Group on Reference Man - A Report Prepared by a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection, Pergamon Press, Oxford.
20. International Commission on Radiological Protection (ICRP). (2002) Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. ICRP Publication 89, Annals of the ICRP 32(3/4).
21. Davies, B., and Morris, T. (1993) Physiological parameters in laboratory animals and humans, Pharmaceutical Research 10, 1093-1095.
22. Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. T., Rhomberg, L. R., and Beliles, R. P. (1997) Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models, Toxicology and Industrial Health 14, 407-484.
23. Young, J. F., Branham, W. S., Sheenan, D. M., Baker, M. E., Wosilait, W. D., and Luecke, R. H. (1997) Physiological "constants" for PBPK models for pregnancy, Journal of Toxicology and Environmental Health 52, 385-401.
24. Price, P. S., Conolly, R. B., Chaisson, C. F., Gross, E. A., Young, J. S., Mathis, E. T., and Tedder, D. R. (2003) Modeling interindividual variation in physiological factors used in PBPK models of humans, Critical Reviews in Toxicology 33, 469-503.
25. Ekins, S., Waller, C. L., Swaan, P. W., Cruciani, G., Wrighton, S. A., and Wikel, J. H. (2000) Progress in predicting human ADME parameters in silico, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 44, 251-272.
26. Poulin, P., and Haddad, S. (2012) Advancing prediction of tissue distribution and volume of distribution of highly lipophilic compounds from a simplified tissue-composition-based model as a mechanistic animal alternative method, Journal of Pharmaceutical Sciences 101, 2250-2261.
27. Butina, D., Segall, M. D., and Frankcombe, K. (2002) Predicting ADME properties in silico: methods and models, Drug Discovery Today 7, S83-S88.
28. Buch, I., Giorgino, T., and De Fabritiis, G. (2011) Complete reconstruction of an enzyme-inhibitor binding process by molecular dynamics simulations, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 108.
29. Fiserova-Bergerova, V., and Diaz, M. L. (1986) Determination and prediction of tissue-gas partition coefficients, International Archives of Occupational and Environmental Health 58, 75-87.

30. Gargas, M. L., Seybold, P. G., and Andersen, M. E. (1988) Modeling the tissue solubilities and metabolic rate constant (Vmax) of halogenated methanes, ethanes, and ethylenes, Toxicology Letters 43, 235-256.

31. Poulin, P., and Theil, F. P. (2000) A priori prediction of tissue:plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery, Journal of Pharmaceutical Sciences 89, 16-35.

32. Liao, K. H., Tan, Y. M., and Clewell, H. J. (2007) Development of a screening approach to interpret human biomonitoring data on volatile organic compounds: reverse dosimetry on biomonitoring data for trichloroethylene, Risk Analysis 27, 1223–1236.

33. Peyret, T., Poulin, P., and Krishnan, K. (2010) A unified algorithm for predicting partition coefficients for PBPK modeling of drugs and environmental chemicals, Toxicology and Applied Pharmacology 249, 197-207.

34. Poulin, P., Ekins, S., and Theil, F. P. (2011) A hybrid approach to advancing quantitative prediction of tissue distribution of basic drugs in human, Toxicology and Applied Pharmacology 250, 194-212.

35. Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., van Benthem, J., Zuang, V., Andersen, K., Angers-Loustau, A., Aptula, A., Bal-Price, A., Benfenati, E., Bernauer, U., Bessems, J., Bois, F. Y., Boobis, A., Brandon, E., Bremer, S., Broschard, T., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Cronin, M., Daston, G., Dekant, W., Felter, S., Grignard, E., Gundert-Remy, U., Heinonen, T., Kimber, I., Kleinjans, J., Komulainen, H., Kreiling, R., Kreysa, J., Leite, S., Loizou, G., Maxwell, G., Mazzatorta, P., Munn, S., Pfuhler, S., Phrakonkham, P., Piersma, A., Poth, A., Prieto, P., Repetto, G., Rogiers, V., Schoeters, G., Schwarz, M., Serafimova, R., Tähti, H., Testai, E., van Delft, J., van Loveren, H., Vinken, M., Worth, A., and Zaldivar, J.-M. (2011) Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects - 2010, Archives of Toxicology 85, 367-485.

36. Bois, F. Y., and Jamei, M. (2012) Population-based pharmacokinetic modeling and simulation, In Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions (Lyubimov, A. V., Ed.), pp 1-27, doi: 10.1002/9780470921920.edm9780470921135, John Wiley & sons, Hoboken.

37. Yuh, L., Beal, S., Davidian, M., Harrison, F., Hester, A., Kowalski, K., Vonesh, E., and Wolfinger, R. (1994) Population pharmacokinetic/pharmacodynamic methodology and applications: a bibliography, Biometrics 50, 566-575.

38. Gelman, A., Bois, F. Y., and Jiang, J. (1996) Physiological pharmacokinetic analysis using population modeling and informative prior distributions, Journal of the American Statistical Association 91, 1400-1412.

39. Bois, F. Y., Jamei, M., and Clewell, H. J. (2010) PBPK modelling of inter-individual variability in the pharmacokinetics of environmental chemicals, Toxicology 278, 256–267.

40. Byrne, G. D., and Hindmarsh, A. C. (1987) Stiff ODE solvers: a review of current and coming attractions, Journal of Computational Physics 70, 1-62.

41. Bois, F. Y. (2009) GNU MCSim: Bayesian statistical inference for SBML-coded systems biology models, Bioinformatics 25, 1453-1454.

42. Bouzom, F., Ball, K., Perdaems, N., and Walther, B. (2012) Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling tools: how to fit with our needs?, Biopharmaceutics and Drug Disposition 33, 55-71.

43. Gupta, S., Manfro, R., Tomlanovich, S., Gambertoglio, J., Garovoy, M., and Benet, L. Z. (1990) Effect of food on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy subjects following oral and intravenous administration, J. Clin. Pharmacol. 30, 643–653.

44. Kawai, R., Mathew, D., Tanaka, C., and Rowland, M. (1998) Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 287, 457-468.

45. Odajima, H., Yamazaki, S., and Nitta, H. (2008) Decline in peak expiratory flow according to hourly short-term concentration of particulate matter in asthmatic children, Inhalation Toxicology 20, 1263–1272.

46. Péry, A., Brochot, C., Hoet, P., Nemmar, A., and Bois, F. Y. (2009) Development of a physiologically-based kinetic model for 99m-Technetium labelled carbon nanoparticles inhaled by humans, Inhalation Toxicology 21, 1099-1107.

47. Nemmar, A., Hoet, P. H. M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., and Nemery, B. (2002) Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans, Circulation 105, 411-414.

48. Mills, N. L., Amin, N., Robinson, S. D., Anand, A., Davies, J., Patel, D., de la Fuente, J. M., Cassee, F. R., Boon, N. A., MacNee, W., Millar, A. M., Donaldson, K., and Newby, D. E. (2006) Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans?, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 173, 426-431.

49. Bernillon, P., and Bois, F. Y. (2000) Statistical issues in toxicokinetic modeling: a Bayesian perspective, Environmental Health Perspectives 108 (suppl. 5), 883-893.

50. Bois, F. Y. (2012) Bayesian inference, In Computational Toxicology, Methods in Molecular Biology Series (Reisfeld, B., and Mayeno, A. N., Eds.), pp 597-636, doi: 510.1007/1978-1001-62703-62059-62705_62725, Humana Press, New-York.

51. International Commission on Radiological Protection (ICRP). (1999) Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals. ICRP Publication 80, Annals of the ICRP 28(3).

52. Wiebert, P., Sanchez-Crespo, A., Seitz, J., Falk, R., Philipson, K., Kreyling, W. G., Möller, W., Sommerer, K., Larsson, S., and Svartengren, M. (2006) Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs, European Respiratory Journal 28, 286–290.

53. Li, M., Panagi, Z., Avgoustakis, K., and Reineke, J. (2012) Physiologically based pharmacokinetic modeling of PLGA nanoparticles with varied mPEG content, International Journal of Nanomedicine 7, 1345–1356.

54. Lee, H. A., Leavens, T. L., Mason, S. E., Monteiro-Riviere, N. A., and Riviere, J. E. (2009) Comparison of quantum dot biodistribution with a blood-flow-limited physiologically based pharmacokinetic model, Nano Letters 9, 794-799.

55. Mager, D. E., Mody, V., Xu, C., Forrest, A., Lesniak, W. G., Nigavekar, S. S., Kariapper, M. T., Minc, L., Khan, M. K., and Balogh, L. P. (2012) Physiologically based pharmacokinetic model for composite nanodevices: effect of charge and size on in vivo disposition, Pharmaceutical Research 29, 2534-2542.

56. Yang, R. S. H., Chang, L. W., Yang, C. S., and Lin, P. (2010) Pharmacokinetics and physiologically-based pharmacokinetic modeling of nanoparticles, Journal of Nanoscience and Nanotechnology 10, 1-8.

57. Li, M., Al-Jamal, K. T., Kostarelos, K., and Reineke, J. (2010) Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles, ACS Nano 4, 6303-6317.

58. Dedrick, R. L., and Bischoff, K. B. (1980) Species similarities in pharmacokinetics, Federation Proceedings 39, 54-59.

59. Parrott, N., Jones, H., Paquereau, N., and Lavé, T. (2005) Application of full physiological models for pharmaceutical drug candidate selection and extrapolation of pharmacokinetics to man, Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 96, 193-196.

60. Mielke, H., Abraham, K., Götz, M., Vieth, B., Lampen, A., Luch, A., and Gundert-Remy, U. (2011) Physiologically based toxicokinetic modelling as a tool to assess target organ toxicity in route-to-route extrapolation - The case of coumarin, Toxicology Letters 202, 100–110.

61. United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1988) Reference physiological parameters in pharmacokinetic modeling, United States Environmental Protection Agency, Washington DC.

62. De Buck, S. S., Sinha, V. K., Fenu, L. A., Gilissen, R. A., Mackie, C. E., and Nijsen, M. J. (2007) The prediction of drug metabolism, tissue distribution, and bioavailability of 50 structurally diverse compounds in rat using mechanism-based absorption, distribution, and metabolism prediction tools, Drug Metabolism and Disposition 35, 649-659.

63. Coecke, S., Pelkonen, O., Batista Leite, S., Bernauer, U., Bessems, J., Bois, F. Y., Gundert-Remy, U., Loizou, G., Testai, E., and Zaldívar, J. M. (in press) Toxicokinetics as a key to the integrated toxicity risk assessment based primarily on non-animal approaches, Toxicology in Vitro.

64. Pritchard, W. G. (1993) Scaling in the animal kingdom, Bulletin of Mathematical Biology 55, 111-129.

65. Bachmann, K., Pardoe, D., and White, D. (1996) Scaling basic toxicokinetic parameters from rat to man, Environmental Health Perspectives 104, 400-407.

66. Rowland, M., Balant, L., and Peck, C. (2004) Physiologically based pharmacokinetics in drug development and regulatory science: a workshop report (Georgetown University, Washington, DC, May 29-30, 2002), The AAPS Journal 6, 56-67.

67. Benjamin, B., Barman, T. K., Chaira, T., and Paliwal, J. K. (2010) Integration of physicochemical and pharmacokinetic parameters in lead optimization: a physiological pharmacokinetic model based approach, Current Drug Discovery Technologies 7, 143-153.

68. Edginton, A. N., and Joshi, G. (2011) Have physiologically-based pharmacokinetic models delivered?, Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 7, 929-934.

69. Chen, Y., Jin, J. Y., Mukadam, S., Malhi, V., and Kenny, J. R. (2012) Application of IVIVE and PBPK modeling in prospective prediction of clinical pharmacokinetics: strategy and approach during the drug discovery phase with four case studies, Biopharmaceutics and Drug Disposition 33, 85-98.

70. Jones, H. M., Gardner, I. B., and Watson, K. J. (2009) Modelling and PBPK simulation in drug discovery, AAPS Journal 11, 155-166.

71. Jamei, M., Marciniak, S., Feng, K. R., Barnett, A., Tucker, G., and Rostami-Hodjegan, A. (2009) The Simcyp population-based ADME simulator, Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 5, 211-223.

72. Cai, H. L., Stoner, C., Reddy, A., Freiwald, S., Smith, D., Winters, R., Stankovic, C., and Surendran, N. (2006) Evaluation of an integrated in vitro-in silico PBPK (physiologically based pharmacokinetic) model to provide estimates of human bioavailability, International Journal of Pharmaceutics 308, 133-139.

73. Poulin, P., Jones, R. D. O., Jones, H. M., Gibson, C. R., Rowland, M., Chien, J. Y., Ring, B. J., Adkison, K. K., Ku, M. S., He, H. D., Vuppugalla, R., Marathe, P., Fischer, V., Dutta, S., Sinha, V. K., Bjornsson, T., Lave, T., and Yates, J. W. T. (2011) PHRMA CPCDC Initiative on Predictive Models of Human Pharmacokinetics, Part 5: Prediction of Plasma Concentration-Time Profiles in Human by Using the Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling Approach, Journal of Pharmaceutical Sciences 100, 4127-4157.

74. Lüpfert, C., and Reichel, A. (2005) Development and application of physiologically based pharmacokinetic-modeling tools to support drug discovery, Chemistry & Biodiversity 2, 1462-1486.

75. Fang, L., and Sun, D. (2008) Predictive physiologically based pharmacokinetic model for antibody-directed enzyme prodrug therapy, Drug Metabolism and Disposition 36, 1153-1165.

76. Strougo, A., Eissing, T., Yassen, A., Willmann, S., Danhof, M., and Freijer, J. (2012) First dose in children: physiological insights into pharmacokinetic scaling approaches and their implications in paediatric drug development, Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 39, 195-203.

77. Watanabe, K., and Bois, F. (1996) Interspecies extrapolation of physiological pharmacokinetic parameter distributions, Risk Analysis 16, 741-754.

78. Willmann, S., Höhn, K., Edginton, A., Sevestre, M., Solodenko, J., Weiss, W., Lippert, J., and Schmitt, W. (2007) Development of a physiology-based whole-body population model for assessing the influence of individual variability on the pharmacokinetics of drugs, Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 34, 401-431.

79. Jamei, M., Dickinson, G. L., and Rostami-Hodjegan, A. (2009) A framework for assessing inter-individual variability in pharmacokinetics using virtual human populations and integrating general knowledge of physical chemistry, biology, anatomy, physiology and genetics: a tale of 'bottom-up' vs 'top-down' recognition of covariates, Drug Metabolism and Pharmacokinetics 24, 53-75.

80. Price, K., Haddad, S., and Krishnan, K. (2003) Physiological modeling of age-specific changes in the pharmacokinetics of organic chemicals in children, Journal of Toxicology and Environmental Health Part A 66, 417-433.

81. Shaffer, C. L., Scialis, R. J., Rong, H., and Obach, R. S. (2012) Using Simcyp to project human oral pharmacokinetic variability in early drug research to mitigate mechanism-based adverse events, Biopharmaceutics and Drug Disposition 33, 72-84.

82. Bjorkman, S. (2005) Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling: theophylline and midazolam as model drugs, British Journal of Clinical Pharmacology 59, 691-704.

83. Edginton, A. N., Schmitt, W., and Willmann, S. (2006) Development and evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for children, Clinical Pharmacokinetics 45, 1013-1034.

84. Edginton, A. N., and Willmann, S. (2008) Physiology-based simulations of a pathological condition: prediction of pharmacokinetics in patients with liver cirrhosis, Clinical Pharmacokinetics 47, 743-752.

85. Bjorkman, S., Wada, D. R., Berling, B. M., and Benoni, G. (2001) Prediction of the disposition of midazolam in surgical patients by a physiologically based pharmacokinetic model, Journal of Pharmaceutical Sciences 90, 1226-1241.

86. Micallef, S., Amzal, B., Bach, V., Chardon, K., Tourneux, P., and Bois, F. Y. (2007) Sequential updating of a new dynamic pharmacokinetic model for caffeine in premature neonates, Clinical Pharmacokinetics 46, 59-74.

87. Gueorguieva, I., Aarons, L., and Rowland, M. (2006) Diazepam pharamacokinetics from preclinical to phase I using a Bayesian population physiologically based pharmacokinetic model with informative prior distributions in Winbugs, Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 33, 571-594.

88. Srinivasan, R. S., Bourne, D. W. A., and Putcha, L. (1994) Application of physiologically-based pharmacokinetic models for assessing drug disposition in space, Journal of Clinical Pharmacology 34, 692-698.

89. Vossen, M., Sevestre, M., Niederalt, C., Jang, I.-J., Willmann, S., and Edginton, A. N. (2007) Dynamically simulating the interaction of midazolam and the CYP3A4 inhibitor itraconazole using individual coupled whole-body physiologically-based pharmacokinetic (WB-PBPK) models, Theoretical Biology and Medical Modelling 4, 13.

90. Bois, F. Y. (2009) Physiologically-based modelling and prediction of drug interactions, Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 106, 154-161.

91. Luecke, R. H., and Wosilait, W. D. (1978) Program to simulate drug elimination interactions: warfarin and BSP - an illustrative example, Computer Programs in Biomedicine 8, 35-43.

92. Luecke, R. H., and Wosilait, W. D. (1979) Drug elimination interactions: analysis using a mathematical model, Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics 7, 629-641.

93. Tardif, R., Laparé, S., Krishnan, K., and Brodeur, J. (1993) Physiologically based modeling of the toxicokinetic interaction between toluene and m-xylene in the rat, Toxicology and Applied Pharmacology 120, 266-273.

94. Haddad, S., Tardif, R., Charest-Tardif, G., and Krishnan, K. (1999) Physiological modeling of the toxicokinetic interactions in a quaternary mixture of aromatic hydrocarbons, Toxicology and Applied Pharmacology 161, 249-257.

95. Rostami-Hodjegan, A., and Tucker, G. (2004) 'In silico' simulations to assess the 'in vivo' consequences of 'in vitro' metabolic drug-drug interactions, Drug Discovery Today: Technologies 1, 441-448.

96. Merrill, E. A., Clewell, R. A., Robinson, P. J., Jarabek, A. M., Gearhart, J. M., Sterner, T. R., and Fisher, J. W. (2005) PBPK model for radioactive iodide and perchlorate kinetics and perchlorate-induced inhibition of iodide uptake in humans, Toxicological Sciences 83, 25-43.

97. Grillo, J. A., Zhao, P., Bullock, J., Booth, B. P., Lu, M., Robie-Suh, K., Berglund, E. G., Pang, K. S., Rahman, A., Zhang, L., Lesko, L. J., and Huang, S. M. (2012) Utility of a physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach to quantitatively predict a complex drug-drug-disease interaction scenario for rivaroxaban during the drug review process: implications for clinical practice, Biopharmaceutics and Drug Disposition 33, 99-110.

98. Sinha, V. K., Snoeys, J., Osselaer, N. V., Peer, A. V., Mackie, C., and Heald, D. (2012) From preclinical to human - prediction of oral absorption and drug-drug interaction potential using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach in an industrial setting: a workflow by using case example, Biopharmaceutics and Drug Disposition 33, 111-121.

99. Buur, J. L., Baynes, R. E., Smith, G. W., and Riviere, J. E. (2009) A physiologically based pharmacokinetic model linking plasma protein binding interactions with drug disposition, Research in Veterinary Science 86, 293-301.

100. Cheng, S., and Bois, F. Y. (2011) A mechanistic modeling framework for predicting metabolic interactions in complex mixtures, Environmental Health Perspectives 119, 1712-1718.

101. Georgopoulos, P. G., Roy, A., and Gallo, M. A. (1994) Reconstruction of short-term multi-route exposure to volatile organic compounds using physiologically based pharmacokinetic models, Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology 4, 309-328.

102. Sohn, M. D., McKone, T. E., and Blancato, J. N. (2004) Reconstructing population exposures from dose biomarkers: inhalation of trichloroethylene as a case study, Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology 14, 204-213.

103. Allen, B. C., Hack, C. E., and Clewell, H. J. (2007) Use of Markov chain Monte Carlo analysis with a physiologically-based pharmacokinetic model of methylmercury to estimate exposures in US women of childbearing age, Risk Analysis 27, 947-959.

104. Ulaszewska, M. M., Ciffroy, P., Tahraoui, F., Zeman, F. A., Capri, E., and Brochot, C. (2012) Interpreting PCB levels in breast milk using a physiologically based pharmacokinetic model to reconstruct the dynamic exposure of Italian women, Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology 22, 601-609.

105. Tan, Y. M., Liao, K. H., and Clewell, H. J. (2006) Reverse dosimetry: interpreting trihalomethanes biomonitoring data using physio- logically based pharmacokinetic modeling, Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology 17, 591–603.

106. Lyons, M. A., Yang, R. S. H., Mayeno, A. N., and Reisfeld, B. (2008) Computational toxicology of chloroform: reverse dosimetry using Bayesian inference, Markov chain Monte Carlo simulation, and human biomonitoring data, Environmental Health Perspectives 116, 1040-1046.

107. Clewell, H. J., Tan, Y. M., Campbell, J. L., and Andersen, M. E. (2008) Quantitative interpretation of human biomonitoring data, Toxicology and Applied Pharmacology 231, 122–133.

108. Bois, F. Y. (2003) Toxicokinetic modelling of 2,3,7,8-tétrachloro-p-dioxin blood concentration after ingestion by women, Environnement, Risque et Santé 2, 45-53.

109. Corley, R. A. (2010) Pharmacokinetics and PBPK models, In Comprehensive Toxicology, vol. 12 (McQueen, C. A., Ed.), pp 27–58, Elsevier, Oxford.

110. Ginsberg, G., Hattis, D., Sonawane, B., Russ, A., Banati, P., Kozlak, M., Smolenski, S., and Goble, R. (2002) Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature, Toxicological Sciences 66, 185-200.

111. Hattis, D., Ginsberg, G., Sonawane, B., Smolenski, S., Russ, A., Kozlak, M., and Goble, R. (2003) Differences in pharmacokinetics between children and Adults - II. Children's variability in drug elimination half-lives and in some parameters needed for physiologically-based pharmacokinetic modeling, Risk Analysis 23, 117-142.

112. Beaudouin, R., Micallef, S., and Brochot, C. (2010) A stochastic whole-body physiologically based pharmacokinetic model to assess the impact of inter-individual variability on tissue dosimetry over the human lifespan, Regulatory Toxicology and Pharmacology 57, 103-116.

113. Luecke, R. H., Pearce, B. A., Wosilait, W. D., Slikker, W., and Young, J. F. (2007) Postnatal growth considerations for PBPK modeling, Journal of Toxicology and Environmental Health Part A 70, 1027-1037.

114. Thompson, C. M., Johns, D. O., Sonawane, B., Barton, H. A., Hattis, D., Tardif, R., and Krishnan, K. (2009) Database for physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling:

physiological data for healthy and health-impaired elderly, Journal of Toxicology and Environmental Health Part B 12, 1-24.

115. van Hasselt, J. G. C., Green, B., and Morrish, G. A. (2012) Leveraging physiological data from literature into a pharmacokinetic model to support informative clinical study design in pregnant women, Pharmaceutical Research 29, 1609-1617.

116. Wosilait, W. D., and Luecke, R. H. (1990) Design considerations for a pregnancy model for warfarin, Mathematical and Computer Modelling 14, 547-550.

117. Luecke, R. H., Wosilait, W. D., Pearce, B. A., and Young, J. F. (1994) A physiologically based pharmacokinetic computer model for human pregnancy, Teratology 49, 90-103.

118. Luecke, R. H., Wosilait, W. D., Pearce, B. A., and Young, J. F. (1997) A computer model and program for xenobiotic disposition during pregnancy, Computer Methods and Programs in Biomedicine 53, 201-224.

119. Corley, R. A., Mast, T. J., Carney, E. W., Rogers, J. M., and Daston, G. P. (2003) Evaluation of physiologically-based models of pregnancy and lactation for their application in children's health risk assessments, Critical Reviews in Toxicology 33, 137-211.

120. Gentry, P. R., Covington, T. R., and Clewell, H. J., III. (2003) Evaluation of the potential impact of pharmacokinetic differences on tissue dosimetry in offspring during pregnancy and lactation, Regulatory Toxicology and Pharmacology 38, 1-16.

121. Verner, M. A., Charbonneau, M., Lopez-Carrillo, L., and Haddad, S. (2008) Physiologically based pharmacokinetic modeling of persistent organic pollutants for lifetime exposure assessment: a new tool in breast cancer epidemiologic studies, Environmental Health Perspectives 116, 886-892.

122. Hayashi, Y., Lipman, J., Udy, A. A., Ng, M., McWhinney, B., Ungerer, J., Lust, K., and Roberts, J. A. (2012) β-lactam therapeutic drug monitoring in the critically ill: optimising drug exposure in patients with fluctuating renal function and hypoalbuminaemia, International Journal of Antimicrobial Agents.

123. Naud, J., Nolin, T. D., Leblond, F. A., and Pichette, V. (2012) Current understanding of drug disposition in kidney disease, Journal of Clinical Pharmacology 52, 10S-22S.

124. Rowland Yeo, K., Aarabi, M., Jamei, M., and Rostami-Hodjegan, A. (2011) Modeling and predicting drug pharmacokinetics in patients with renal impairment, Expert Review of Clinical Pharmacology 4, 261-274.

125. Young, J. F., Luecke, R. H., Pearce, B. A., Lee, T., Ahn, H., Baek, S., Moon, H., Dye, D. W., Davis, T. M., and Taylor, S. J. (2009) Human organ/tissue growth algorithms that include obese individuals and black/white population organ weight similarities from autopsy data, Journal of Toxicology and Environmental Health Part A 72, 527-540.

126. Darwich, A. S., Pade, D., Ammori, B. J., Jamei, M., Ashcroft, D. M., and Rostami-Hodjegan, A. (2012) A mechanistic pharmacokinetic model to assess modified oral drug bioavailability post bariatric surgery in morbidly obese patients: interplay between CYP3A gut wall metabolism, permeability and dissolution, Journal of Pharmacy and Pharmacology 64, 1008-1024.

127. Bois, F. Y., Zeise, L., and Tozer, T. N. (1990) Precision and sensitivity analysis of pharmacokinetic models for cancer risk assessment: tetrachloroethylene in mice, rats and humans, Toxicology and Applied Pharmacology 102, 300-315.

128. Brochot, C., Smith, T. J., and Bois, F. Y. (2007) Development of a physiologically based toxicokinetic model for butadiene and four major metabolites in humans: Global sensitivity analysis for experimental design issues, Chemico-Biological Interactions 167, 168-183.

129. Yang, J., Jamei, M., Yeo, K. R., Tucker, G. T., and Rostami-Hodjegan, A. (2007) Prediction of intestinal first-pass drug metabolism, Current Drug Metabolism 8, 676-684.

130. Jamei, M., Turner, D., Yang, J. S., Neuhoff, S., Polak, S., Rostami-Hodjegan, A., and Tucker, G. T. (2009) Population-based mechanistic prediction of oral drug absorption, The AAPS Journal 11, 225-237.

131. Thelen, K., Coboeken, K., Willmann, S., Burghaus, R., Dressman, J. B., and Lippert, J. (2011) Evolution of a detailed physiological model to simulate the gastrointestinal transit and absorption process in humans - Part 1: oral solutions, Journal of Pharmaceutical Sciences 100, 5324-5345.

132. Frederick, C. B., Lomax, L. G., Black, K. A., Finch, L., Scribner, H. E., Kimbell, J. S., Morgan, K. T., Subramaniam, R. P., and Morris, J. B. (2002) Use of a hybrid computational fluid dynamics and physiologically based inhalation model for interspecies dosimetry comparisons of ester vapors, Toxicology and Applied Pharmacology 183, 23-40.

133. Rostami, A. A. (2009) Computational modeling of aerosol deposition in respiratory tract: a review, Inhalation Toxicology 21, 262-290.

134. Frank, D. O., Kimbell, J. S., Cannon, D., and Rhee, J. S. (2012) Computed intranasal spray penetration: comparisons before and after nasal surgery, International Forum of Allergy & Rhinology, doi: 10.1002/alr.21070.

135. McCarley, K. D., and Bunge, A. L. (2001) Pharmacokinetic models of dermal absorption, Journal of Pharmaceutical Sciences 90, 1699-1719.

136. Krüse, J., Golden, D., Wilkinson, S., Williams, F., Kezic, S., and Corish, J. (2007) Analysis, interpretation, and extrapolation of dermal permeation data using diffusion-based mathematical models, Journal of Pharmaceutical Sciences 96, 682-703.

137. Mitragotri, S., Anissimov, Y. G., Bunge, A. L., Frasch, H. F., Guy, R. H., Hadgraft, J., Kasting, G. B., Lane, M. E., and Roberts, M. S. (2011) Mathematical models of skin permeability: an overview, International Journal of Pharmaceutics 418, 115-129.

138. Polak, S., Ghobadi, C., Mishra, H., Ahamadi, M., Patel, N., Jamei, M., and Rostami-Hodjegan, A. (2012) Prediction of concentration–time profile and its inter-individual variability following the dermal drug absorption, Journal of Pharmaceutical Sciences, doi: 10.1002/jps.23155.

139. Burt, H. J., Neuhoff, S., Lu, G., Jamei, M., Tucker, G. T., and Rostami-Hodjegan, A. (2012) Simulation of the effect of urine pH on renal drug clearance using a novel population based mechanistic kidney model (Mech KiM), In 42nd Drug Metabolism Gordon Conference, Holderness.

140. Simcyp Ltd. (Revised and updated by R. Clayton). (2012) A Guide for IVIVE and PBPK/PD Modelling using the Simcyp Population-based Simulator (Version 12), Simcyp Ltd., Sheffield, UK.

141. Hunt, C. A., Ropella, G. E. P., Yan, L., Hung, D. Y., and Roberts, M. S. (2006) Physiologically based synthetic models of hepatic disposition, Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 33, 737-772.

142. Kavlock, R. J., Ankley, G., Blancato, J., Breen, M., Conolly, R., Dix, D., Houck, K., Hubal, E., Judson, R., Rabinowitz, J., Richard, A., Setzer, R. W., Shah, I., Villeneuve, D., and Weber, E.

(2008) Computational toxicology - A state of the science mini review, Toxicological Sciences 103, 14-27.

143. Hunt, C. A., Ropella, G. E., Lam, T. N., Tang, J., Kim, S. H., Engelberg, J. A., and Sheikh-Bahaei, S. (2009) At the biological modeling and simulation frontier, Pharmaceutical Research 26, 2369-2400.

144. Andersen, M. E., Eklund, C. R., Mills, J. J., Barton, H. A., and Birnbaum, L. S. (1997) A multicompartment geometric model of the liver in relation to regional induction of cytochrome P450s, Toxicology and Applied Pharmacology 144, 135-144.

145. Sheikh-Bahaei, S., Kim, S. H. J., Sheikhbahaei, S., and Hunt, C. A. (2009) Understanding the role of liver zonation in toxin elimination, International Journal of Intelligent Control and Systems 14, 33-40.

146. Manning, C. C., Schlosser, P. M., and Tran, H. T. (2010) A multicompartment liver-based pharmacokinetic model for benzene and its metabolites in mice, Bulletin of Mathematical Biology 72, 507-540.

147. Eissing, T., Kuepfer, L., Becker, C., Block, M., Coboeken, K., Gaub, T., Goerlitz, L., Jaeger, J., Loosen, R., Ludewig, B., Meyer, M., Niederalt, C., Sevestre, M., Siegmund, H.-U., Solodenko, J., Thelen, K., Telle, U., Weiss, W., Wendl, T., Willmann, S., and Joerg Lippert, J. (2011) A computational systems biology software platform for multiscale modeling and simulation: integrating whole-body physiology, disease biology, and molecular reaction networks, Frontiers in Physiology 2, 1-10, doi: 10.3389/fphys.2011.00004.

148. Geenen, S., Taylor, P. N., Snoep, J. L., Wilson, I. D., Kenna, J. G., and Westerhoff, H. V. (2012) Systems biology tools for toxicology, Archives of Toxicology 86, 1251-1271.

149. Mager, D. E. (2006) Target-mediated drug disposition and dynamics, Biochemical Pharmacology 72, 1-10.

150. Gao, W., and Jusko, W. J. (2012) Target-mediated pharmacokinetic and pharmacodynamic model of exendin-4 in rats, monkeys, and humans, Drug Metabolism and Disposition 40, 990-997.

151. Schuster, D., Steindl, T. M., and Langer, T. (2006) Predicting drug metabolism induction in silico, Current Topics in Medicinal Chemistry 6, 1627-1640.

152. Yang, J. S., Liao, M. X., Shou, M. G., Jamei, M., Yeo, K. R., Tucker, G. T., and Rostami-Hodjegan, A. (2008) Cytochrome P450 turnover: Regulation of synthesis and degradation, methods for determining rates, and implications for the prediction of drug interactions, Current Drug Metabolism 9, 384-393.

153. Wang, X., Santostefano, M. J., Evans, M. V., Richardson, V. M., Diliberto, J. J., and Birnbaum, L. S. (1997) Determination of parameters responsible for pharmacokinetic behavior of TCDD in female Sprague-Dawley rats, Toxicology and Applied Pharmacology 147, 151-168.

154. Smuszkiewicz, P., Szalek, E., Tomczak, H., and Grzeskowiak, E. (2012) Continuous infusion of antibiotics in critically ill patients, Current Clinical Pharmacology.

155. Graf, J. F., Scholz, B. J., and Zavodszky, M. I. (2012) BioDMET: a physiologically based pharmacokinetic simulation tool for assessing proposed solutions to complex biological problems, Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 39, 37-54.

156. Brochot, C., Bessoud, B., Balvay, D., Cuénod, C.-A., Siauve, N., and Bois, F. Y. (2006) Evaluation of antiangiogenic treatment effects on tumors microcirculation by Bayesian physiological pharmacokinetic modeling and magnetic resonance imaging, Magnetic Resonance Imaging 24, 1059-1067.

157. Barboriak, D. P., MacFall, J. R., Viglianti, B. L., and Dewhirst, M. W. (2008) Comparison of three physiologically-based pharmacokinetic models for the prediction of contrast agent distribution measured by dynamic MR imaging, Journal of Magnetic Resonance Imaging 27, 1388-1398.

158. Corley, R. A., Minard, K. R., Kabilan, S., Einstein, D. R., Kuprat, A. P., Harkema, J. R., Kimbell, J. S., Gargas, M. L., and Kinzell, J. H. (2009) Magnetic resonance imaging and computational fluid dynamics (CFD) simulations of rabbit nasal airflows for the development of hybrid CFD/PBPK models, Inhalation Toxicology 21, 512-518.

159. Sugiyama, Y., and Yamashita, S. (2011) Impact of microdosing clinical study - why necessary and how useful?, Advanced Drug Delivery Reviews 63, 494-502.

160. Derado, G., Bowman, F. D., and Kilts, C. D. (2010) Modeling the spatial and temporal dependence in FMRI data, Biometrics 66, 949-957.

161. National Research Council (NRC) (2007) Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and A Strategy, National Academy Press, Washington, DC.

162. Viravaidya, K., Sin, A., and Shuler, M. L. (2004) Development of a microscale cell culture analog to probe naphtalene toxicity, Biotechnology Progress 20, 316–323.

163. El-Ali, J., Sorger, P. K., and Jensen, K. F. (2006) Cells on chips, Nature 442, 403–411.

164. Tatosian, D. A., and Shuler, M. L. (2009) A novel system for evaluation of drug mixtures for potential efficacy in treating multidrug resistant cancers, Biotechnology Bioengineering 103, 187-198.

165. Chao, P., Maguire, T., Novik, E., Cheng, K. C., and Yarmush, M. L. (2009) Evaluation of a microfluidic based cell culture platform with primari human hepatocytes for the prediction of hepatic clearance in human, Biochemical Pharmacology 78, 625-632.

166. Maguire, T. J., Novik, E., Chao, P., and Cheng, K.-C. (2009) Design and application of microfluidic systems for in vitro pharmacokinetic evaluation of drug candidates, Current Drug Metabolism 10, 1192-1199.

167. Sung, J. H., Esch, M. B., and Shuler, M. L. (2010) Integration of in silico and in vitro platforms for pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling, Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 6, 1063-1081.

168. Viravaidya, K., and Shuler, M. L. (2004) Incorporation of 3T3-L1 cells to mimic bioaccumulation in a microscale cell culture analog device for toxicity studies, Biotechnology Progress 20, 590-597.

169. Caldwell, J. C., Evans, M. V., and Krishnan, K. (2012) Cutting edge PBPK models and analyses: providing the basis for future modeling efforts and bridges to emerging toxicology paradigms, Journal of Toxicology 2012, doi:10.1155/2012/852384.

170. Zhao, P., Zhang, L., Grillo, J. A., Liu, Q., Bullock, J. M., Moon, Y. J., Song, P., Brar, S. S., Madabushi, R., Wu, T. C., Booth, B. P., Rahman, N. A., Reynolds, K. S., Berglund, E. G., Lesko, L. J., and Huang, S. M. (2011) Applications of physiologically based pharmacokinetic (pbpk) modeling and simulation during regulatory review, Clin. Pharmacol. Ther. 89, 259-267.

171. Loizou, G., Spendiff, M., Barton, H. A., Bessems, J., Bois, F. Y., Bouvier d'Yvoire, M., Buist, H., Clewell, H. J., III, Meek, B., Gundert-Remy, U., Goerlitz, G., and Schmitt, W. (2008) Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: the first steps, Regulatory Toxicology and Pharmacology 50, 400-411.

172. Zhao, P., Rowland, M., and Huang, S.-M. (2012) Best practice in the use of physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation to address clinical pharmacology regulatory questions, Clin. Pharmacol. Ther. 92, 17-20.

173. Rostami-Hodjegan, A., Tamai, I., and Pang, K. S. (2011) Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling: it is here to stay!, Biopharmaceutics and Drug Disposition 33, 47-50.

174. Geenen, S., Yates, J., Kenna, J. G., Bois, F. Y., Wilson, I. D., and Westerhoff, H. V. (in press) Multiscale modelling approach combining a kinetic model of glutathione metabolism with PBPK models of paracetamol and glutathione-depleting biomarkers ophthalmic acid and 5-oxoproline in humans and rats, Integrative Biology.

Acknowledgements

This work was partly supported by the European Commission, 7th FP project PREDICT-IV (grant agreement #202222) and the French Ministry for the Environment (PRG189_ 08_DRC03).

3.1.4 EXTRAPOLATING *IN VITRO* RESULTS TO PREDICT HUMAN TOXICITY

(chapitre issu de *In Vitro Toxicology Systems*, Price A., Jennings P., Eds, Methods in Pharmacology and Toxicology series, Springer Science, New York, USA)

Nadia Quignot[1], Jérémy Hamon[2], Frederic Y. Bois[2,3]

[1] LA-SER, Strategy & Decision Analytics, 10 place de la Catalogne, 75014 Paris, France.

[2] Technological University of Compiègne, Chair of Mathematical Modeling for Systems Toxicology, Royallieu Research Center, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France.

[3] INERIS, DRC/VIVA/METO, Parc ALATA, BP 2, 60550 Verneuil en Halatte, France.

Email: frederic.bois@utc.fr

Running head: *In vitro* to *in vivo* extrapolation

Contents:

1. Extrapolating: What and Why?.....205
2. Extrapolating Pharmacokinetics..... 209
Which models?..... 209
Using PBPK models for QIVIVE.....211
An example of PBPK model application.....215
In vitro PK models.....216
3. Extrapolating Pharmacodynamics..... 217
Simple dose-response models.....218
Systems biology models..... 218
The variability question..... 219
4. Addressing the PK/PD Continuum..... 220
5. Further Challenges.....221
Analytical chemistry.....221

Increasingly complex data..... 222
Model complexity..... 223
6. Conclusion..... 224
7. References..... 224

i. Summary

The increasing use of *in vitro* systems in pharmacology and toxicology has the potential to yield high-throughput screening of molecules and in-depth mechanistic evaluations of toxicity. However, the relevance of results obtained from simplified systems to humans may be questionable. To address that issue, consistent and reliable extrapolation procedures from *in vitro* results to human *in vivo* are needed. Developing those procedures requires to first understand the basis and limitations of *in vitro* experiments, as well as the needs of risk assessment and safety evaluation. This chapter gives an overview of the strategies used for quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolations (QIVIVE) in pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), up to the PK/PD continuum. Their scientific and technical challenges are also discussed.

ii. Key Words

Complexity, computational models, *in vitro* models, pathways of toxicity, pharmacodynamics, pharmacokinetics, prediction, omics data integration, quantitative extrapolation, toxicity, variability.

1. Extrapolating: What and Why?

Ethical, scientific, and economic incentives are driving the reduction of toxicity testing in animals, with the eventual aim of complete replacement. However, the relationships between the administered dose of a chemical and its effects can be extremely complex and varied in humans. Animals (in particular mammals) are quite similar to humans in complexity and body plan, and so far animal experiments have probably been a best way to predict (by analogy) human response, in the absence of human data. If we are to move away from animal studies, we can fill the gaps with human observations based on the measurement of specific biomarkers or/and use simpler biological systems such as *in vitro* cell cultures. We will focus here on that second approach. *In vitr*o cell cultures, even when using human cells – an advantage over animal experiments – lack the complexity of a complete organism. To fill that gap, two solutions again are available: (*i*) to increase the complexity of *in vitro* systems to reproduce tissues and interactions between them (as in "human on chip" systems [1]), or (*ii*) to use mathematical modelling to numerically simulate the

behavior of the complex system, using *in vitro* data to provide model parameter values. Those solutions are complementary in the sense that some, even if limited, amount of mathematical modeling will be needed anyway to scale up the results of "human on chip" assays to a full body. Conversely, better *in vitro* systems will provide better input data to mathematical models. We will therefore concentrate on the unifying theme of modelling, with the understanding that increasingly sophisticated *in vitro* experiments will provide increasingly numerous, complex and challenging data to integrate.

Extrapolating toxicity endpoints observations to *in vivo* is our ultimate goal. It can be reached in two laps: *i*. dealing with pharmacokinetics (PK) and *ii*. dealing with pharmacodynamics (PD). PK or toxicokinetics (TK) describes quantitatively the fate of molecules in the body; PD or toxicodynamics (TD) focuses on their effects (therapeutic or toxic) at the biological target(s) level. It is classical to differentiate PK from PD, but they form a continuum and may feedback one on each other [2]. Obviously, PK conditions PD, since the timing and intensity of effects on a given target depend on the concentration time-course of the active chemical species (parent molecule or metabolites) at that target site. Because of PK effects, *in viv*o tissue and organ sensitivities can be very different or even inverse of those observed on cells cultured and exposed *in vitr*o. That implies that extrapolating effects observed *in vitro* requires a quantitative model of *in vivo* PK. It is now accepted that physiologically based PK (PBPK) models are also central to such extrapolations [2,3]. There is currently no way otherwise to integrate meaningfully *in vitro* PK data nor to extrapolate them to humans. PBPK models are not just curves fitted to the data. They have a mechanistic basis with a large domain of applicability, extending usually much beyond the time and dose range of the observed data. *In vitro* data are indeed essential to inform models structure and parameter values, but other sources of information that may also be available need to be considered (clinical PK or physico-chemical data on the molecule of interest, *etc*.) (Figure 1).

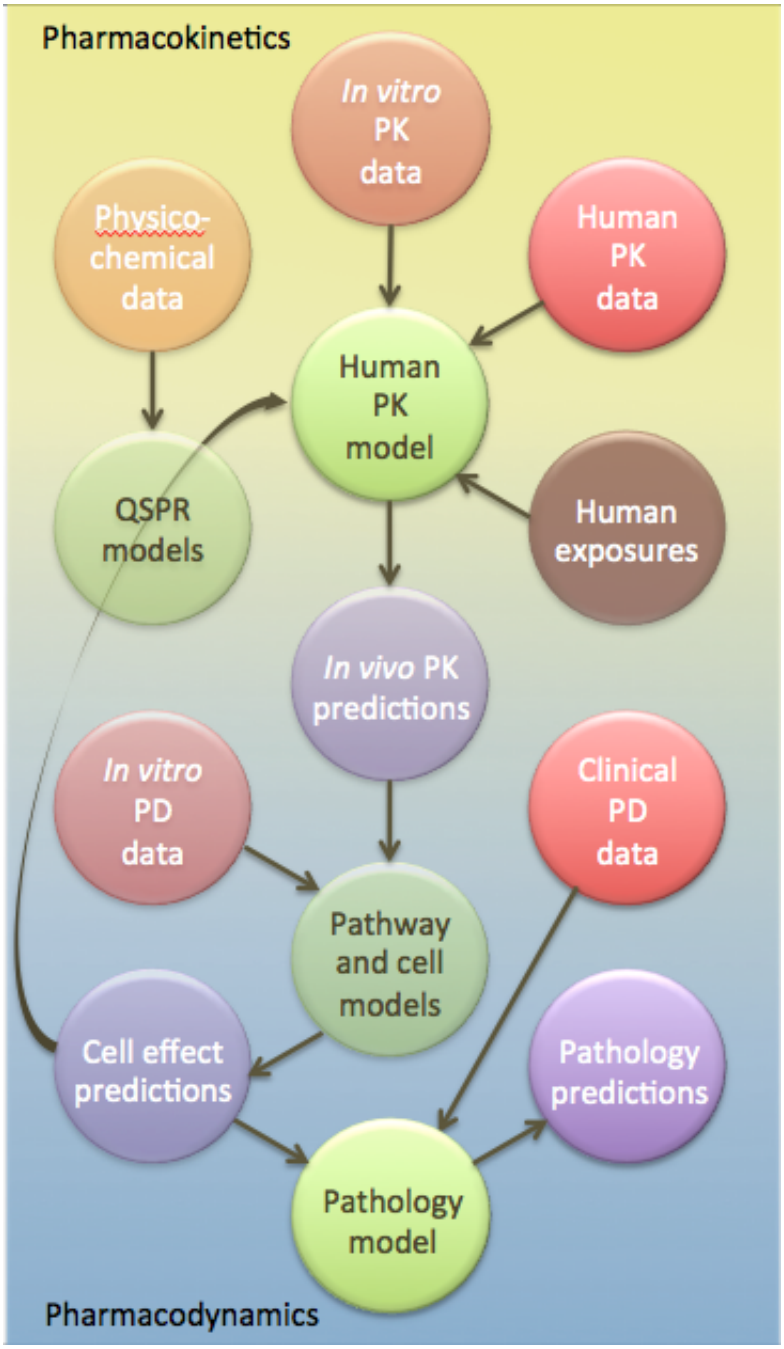


Figure 1: Main ingredients of quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation and prediction of toxicity. Predictions (in blue) are made by several types of models (in green) for *in vivo* PK, *in vivo* cellular effects, and finally pathology (toxicity) endpoints. Those models should be able to integrate data (in red) coming from various sources.

The second step is to predict the pharmacodynamic or toxicity response of human subjects. A basic tenet of the current practice is to assume that the same cellular exposure concentration leads to the same effects, both qualitatively and quantitatively, *in vitro* and *in vivo*. In that case, it is enough to

(*i.*) develop a PD model of the dose-response relationship observed *in vitro* and (*ii.*) transpose it without changes to predict *in vivo* effects, with an *in vivo* input concentration profile reconstructed with a PBPK model, as mentioned above. It is important to recognise, however, that cells in cultures do not mimic perfectly cells in tissues. There are numerous reasons for that, and the reader is referred to the relevant chapters of this book for details. We therefore face a cell to cell extrapolation problem. The solution envisioned is to rely on systems biology mechanistic models of the cell response. Those models are characterized by a hierarchical structure, ranging from molecular pathways, organelle function, whole cell response, cell to cell communications, tissue response, up to inter-tissues communications [4]. Yet, for local and early responses only the first three levels may be sufficient, and *in vitro* data, in particular based on omics approaches (see Chapter 3.2.2), address those levels in particular. When aiming to predict toxicity for humans we face another problem: in addition to extrapolating from a diverse set of cells and assays, we also need to extrapolate to a diverse human population, presenting variability in physiological components, metabolism, *etc*.

While it is clear that PK feeds into PD, the reverse is rarely taken into account. Retro-actions of PD on PK, if they occur, are likely to manifest themselves after some latency and with complex mechanisms. Predictive models for such effects (notably for cumulative effects, developmental toxicity or carcinogenesis) should therefore cover the whole PK/PD continuum, and that poses specific problems.

There are further challenges to QIVIVE:

- Developing more accurate and sensitive analytical chemistry methods for *in vitro* measurements of chemicals and metabolites concentration, in particular inside cells.
- Addressing data complexity: In order to address biological complexity, increasingly sophisticated and high-throughput tests have been developed. They yield increasingly complex data, and in massive amounts. The analysis of such data with statistical and computational tools constitutes a real challenge.
- Addressing the living systems complexity: In the context of toxicity predictions, the description of a single effect on an identified target is usually not sufficient, and multiple targets have to be tracked. Those targets interact, even though they are distributed across a scale of increasing

complexity, going from molecules, to cells, to organs, to the whole body. We have so far developed models addressing usually only one level of that hierarchy and an integration of those models, however challenging, is required.

The last two challenges are linked. To analyse a mass of data, each operation on them should be as simple as possible. For example, in a gene regulation network, we probably do not want to model the genes at the atom level, but rather at the single gene or pathway level. Conversely, living systems are obviously complex, and we will probably need correspondingly complex models to predict their behaviour. Simple models or complex models? The balance is not easy to find, even keeping in mind that models should be fit for purpose.

In this chapter, we will address PK first, describing the models used, and in particular PBPK models. We will then focus on PD, with either simple dose-response models or systems biology models. The two last sections will deal with the PK/PD continuum and the above challenges before attempting to reach a conclusion.

2. Extrapolating Pharmacokinetics

Which models?

As explained above, accounting for PK – or more precisely having quantitative estimates of the concentration *vs.* time profiles at the various target sites of the body – is necessary when extrapolating *in vitro* assay results to predict *in vivo* efficacy or toxicity. Obviously, such PK profiles cannot be obtained from simple *in vitro* cell cultures, since there is no relationship between the structure and the physiology of a whole body and such cell cultures. More sophisticated *in vitro* systems exist, such as "human on chip" microsystems, in which various cell types are cultivated in different miniaturized chambers linked by a microfluidic network in which a cell culture medium is circulated to mimic blood flow through organs [5,6]. However, even in that case, we need extrapolation modelling to scale up the data obtained to the target animal species (typically humans). A purely experimental approach would also be quite expensive if PK were to be predicted

for various dosing schedules and levels. We will see in the following section how PBPK computational models can help.

It is also necessary to understand the fate of the chemical in the *in vitro* system used, be it simple or complex. The nominal *in vitro* dose applied is not informative enough on cell exposure: substances can attach to assay system walls or culture medium proteins, be degraded passively or actively, evaporate, penetrate cells differently from *in vivo, etc*. Knowing that, it is clearly more opportune to use intracellular concentration as a basis for extrapolation, rather than plasma or even unbound plasma concentration. Therefore, a computational model of *in vitro* PK able to estimate intracellular concentrations, together with the relevant data are also needed, as described in a specific section below.

Interestingly, the importance of PK has been somewhat obscured by animal experiments, since they can be analysed "at face value" by simply relating administered dose to effects, without "worrying" about PK. It is only when questions related to mechanistic considerations for extrapolation between animals and humans, *e.g.,* for different routes of exposure, that PK started to be investigated by the US NTP carcinogenicity program [7]. The same epistemic phenomenon is observed for *in vitro* assays, when they simply relate nominal dose to observed effects, without realizing that cellular concentrations and *in vitro* PK are absolutely needed if a reliable extrapolation to *in vivo* conditions is sought [8-10]. Note that the same tools can be applied for pure *in vitro* to *in vivo* PK extrapolation, *i.e.*, extrapolating only *in vitro* data on PK without effect or toxicity data (the reader is also referred to the chapter on *in vitr*o approaches to predictive TK in the same volume).

Models simpler than PBPK ones can also be used, and might be appealing in high throughput contexts [3] or when data are sparse or development time limited. In a recent paper, however, Wetmore *et al.* [11] show that the use of a simplistic pharmacokinetic model to adjust the results of *in vitro* assays does not significantly improve their ability to predict *in vivo* effects. That conclusion is limited by the fact that *in vitro* kinetics was ignored and that a wide range of cell types were studied *in vitro*, to predict results in various animal species *in vivo*. It is clear that the same animal species (preferably humans) should be used for *in vitro* assays and *in vivo* comparisons. Beyond that, several assumptions made by simple models can be inadequate. In the study cited, for each

chemical, steady-state kinetics was assumed (that is a general way to simplify calculations). Steady-state levels can be very different from transient or dynamic equilibrium levels. For simplicity, each chemical was assumed to have 100% oral bioavailability, which is known to be incorrect. Excretion was limited to (rudimentary) hepatic metabolism and glomerular filtration, while much more complex elimination kinetics is common. These assumptions should generally be conservative from a human health standpoint, but the point here is about being right about extrapolation, not about being conservative (which means little in this context). Finally, PK was only evaluated for the parent compound and no attempt was made to evaluate biological activities and dosimetry of metabolites. This can be a real problem where metabolites have biological effects [2]. Solving all these problems basically amounts to taking the steps presented next.

Using PBPK models for QIVIVE

There is no magic formula for extrapolating concentration *vs.* time profiles from *in vitro* to *in vivo*. We know that differences between the two can be ascribed to differences in the underlying physical and biochemical processes involved, or to different parameter values for the same processes. We can nowadays predict with PBPK models the PK of about any chemical in humans, almost from first principles [12]. All we need for those models are good parameter values for the molecule of interest.

But what are those parameters? PBPK models address the four major processes governing a chemical's fate in the body. Those processes go by the acronym of "ADME": Absorption (A) at the administration or exposure site, distribution (D) throughout the body fluids and tissues, eventually metabolism (M), and excretion (E) from the body [13]. To describe them simply, without going to the details of every tissue, cell, or segment of vasculature, current generic PBPK models divide the body into homogeneous compartments, corresponding to its major organs or tissues [14-16] (see Figure 2). A set of mathematical transport and biochemical equations, based on the anatomy and physiology of the target animal species and on the properties of the target molecule, describes its ADME. Those equations, rooted in physics and chemistry, specify the rate of change for the number of molecules, equivalently mass of chemical, in each compartment. For example, the equation for the fat compartment in Figure 2 is typically written as:

$$\frac{dQ_{fat}}{dt} = F_{fat} C_{art} - F_{fat} \frac{C_{fat}}{P_{fat}} \quad (1)$$

This simply says that the variation in the quantity of the chemical in fat, per unit time, is the difference between the quantity imported by blood flow (blood flow F_{fat} times the concentration of the substance in arterial blood C_{art}) and the quantity exported by the same flow in venous blood at the exit of the fat tissues (equal to the concentration in fat C_{fat} divided by an affinity constant for the tissue relative to blood P_{fat}). For other compartments, more terms can be added to describe absorption, metabolism, or excretion. There is one such equation per compartment, at least, and their solution can be computed numerically with specialized software [12]. Solving the equations gives predictions of the concentration of the chemical of interest and its metabolites in every organ or tissue of the body, as a function of time, dosing schedule and amount, exposure route, *etc*. For details the reader should refer to the numerous reviews on the subject [e.g., 12,17].

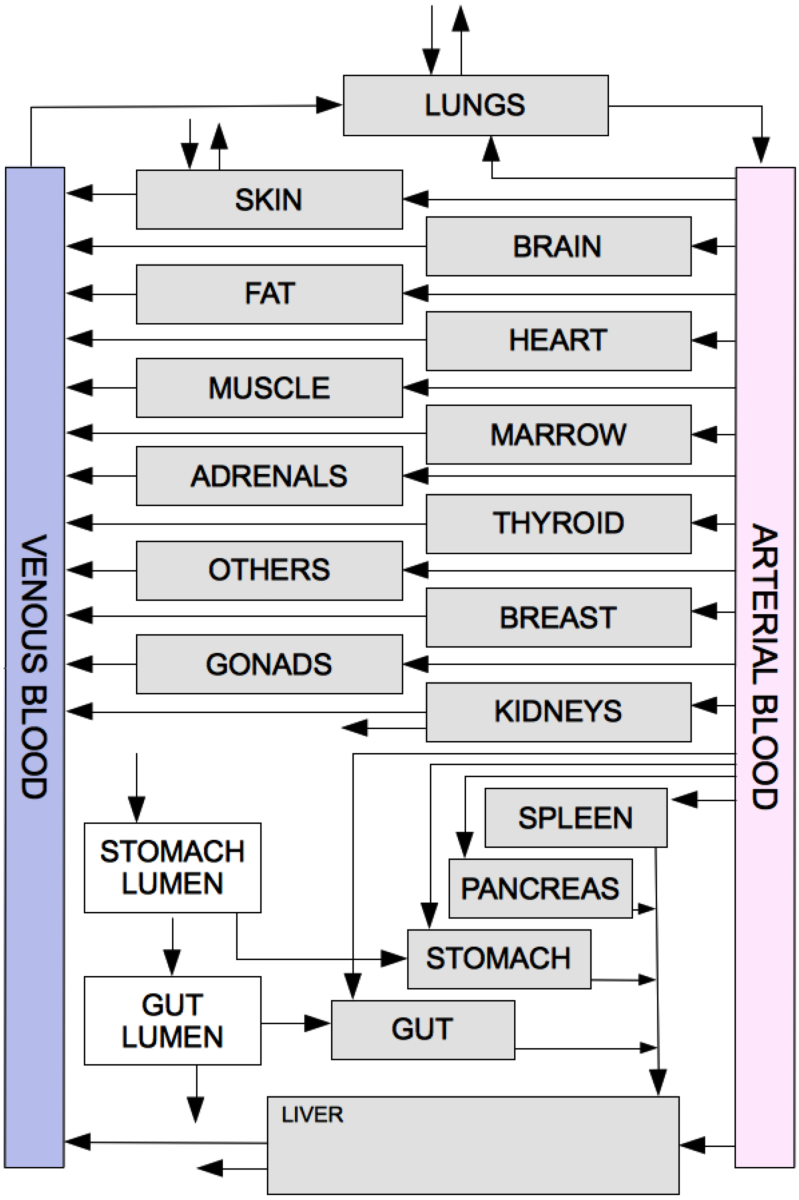


Figure 2: A PBPK model. The body is described as a set of compartments corresponding to organs, group of organs or tissues. The arrows indicate inputs, outputs and transport between those compartments by blood, lymph, or diffusion. The corresponding mathematical equations can be used to compute concentrations or quantities of one or several substances in any compartment as a function of time, dose, body and substances characteristics.

The structure of PBPK models is fairly well defined and does not need to be changed, except for some particular chemicals, for which *in vitro* data would indicate unusual ADME properties. The major problem in PBPK modelling is thus the setting of parameter values. A first set of parameters

is purely physiological and anatomical (*e.g.*, organ volumes, blood flows, pulmonary ventilation, glomerular filtration rate). They can be specifically measured on human subjects, but for most of them values have already been published and can be found in the general literature or in specific databases [18-20]. A second set are chemical-specific parameters (*e.g.*, solubility, dissociation constants, lipidic affinity constants, partition coefficients) that can be computed from quantitative structure-property relationships (QSPR) [14,21,22] or more sophisticated predictive chemistry models [23]. Note that some of the experimental data used to derive QSPR may be obtained *in vitro*, in which case QSPR are just an intermediate layer of modeling between PBPK and laboratory experiments. The last set of parameters are chemical-specific and best estimated directly from *in vitro* assays [2,3] or computational tools. Absorption rate depends on the physiology of the epithelial tissue at the absorption site (permeability, presence of influx or efflux transporters, metabolic capacity...) and on the compound properties. Absorption following oral exposure is typically assessed with *in vitro* models such as the Caco-2 cell line [2]. Getting information on dermal absorption is still an issue, despite the fact that several *in vitro* [24] or QSPR models are available for predicting skin permeability parameters [25,26]. Mimicking lung absorption *in vitr*o is also quite difficult, but recent progress has been made in that direction [27]. Distribution in the organism is governed by three main factors: plasma protein binding, partition coefficients (between blood and specific tissues) [28], and membrane permeability for the molecule (which in turn may depend on affinity for specific transporters)[29]. Work on physiological barriers permeability is progressing (see the relevant Chapter in this volume). Estimation of plasma protein binding is important because usually only the free (unbound) fraction of a compound is available for diffusion and transport across cell membranes (although exceptions may occur in the case of binding to proteins internalised by endocytosis, for example). *In vitro*, it can be estimated by equilibrium dialysis (the reference method) [30], ultrafiltration [31], or ultracentrifugation [32]. Metabolism is important to understand, because it can be an elimination and/or an activation route for the substance studied. However, many enzymes, with different isoforms, can be involved in biotransformation, which make metabolic pathways difficult to assess and even more to predict. Currently, the best assays for metabolism screening and metabolic rate assessment are human hepatocytes or hepatocyte-like cell lines. Note that when metabolites have an effect, their PK should be described and modelled [33]. The two most important routes for excretion of xenobiotics and

their metabolites are the urinary and biliary routes. In the kidney, excretion mechanisms involve the interplay of passive phenomena and active transport. *In vitro* systems are not well developed in that area, but QSPR models coupled to a detailed physiological model able to predict renal excretion have been recently proposed [34]. For biliary excretion, when the compound is metabolised in hepatocytes by phase II enzymes, the resulting products are then transported most of time across the canalicular membrane to be excreted into the bile. However there are still few *in vitr*o or *in silic*o methods to estimate biliary excretion [35,36]. All the above PBPK parameters can be affected by a statistical variability due to human heterogeneity, but there are well established methods to assess the extent of that effect and its impact of the PK of drugs and other chemicals in the body in predictive contexts [19,37].

An example of PBPK model application

Yang *et al.* [38] demonstrate the use of a PBPK model in QIVIVE for β-chloroprene risk assessment. β-Chloroprene is a volatile, yet persistent, organic pollutant. It is carcinogenic by inhalation in the rodent bioassays. To better assess its potential effects in humans, Yang *et al.* parametrized a β-chloroprene PBPK model and evaluated the impact of species and gender differences in its metabolism on target tissue doses. β-Chloroprene metabolism was measured *in vitro* using liver, lung microsomes from female mice and rats, kidney microsomes from mice (female and male), rats (female and male) and humans (both sexes mixed). A two-compartment PK model was used to estimate species- and sex-specific metabolic parameter values for β-chloroprene intrinsic clearance, or the couple (V_{max}, K_m), from data obtained in the *in vitro* assays. A two-level hierarchical Bayesian statistical analysis [39] was used to estimate the gender variability of the *in vitro* metabolic parameters as well as the uncertainty in their values. The approach is hierarchical in the sense that the uncertain population level (species) parameters at the top level define the variability of the lower-level (gender) parameter values.

The parameter values obtained were then plugged into a whole body PBPK model for the corresponding species. The PBPK models used were adapted from [40]. Their common basis is a flow-limited PBPK model with six compartments (lung, liver, kidney, fat, slowly and rapidly perfused tissues). β-Chloroprene metabolism in lung, liver and kidney was modelled in the same

way as in the two-compartment *in vitro* PK model. The average amount of β-chloroprene metabolised per gram of tissue per day (AMD) in the three target tissues was then simulated with the PBPK model, at the doses used in the cancer bioassays, thereby reconstructing the internal doses that had not been measured *in vivo*. The results indicated for example that the lung AMD estimates for humans were lower than that of rats and mice, albeit they were affected by a large uncertainty. That is an example of how PBPK and QIVIVE can be used to give better estimates of human risks on the basis of *in vitro* data. The exercise, however, was not fully predictive in fact since animal data were available to formulate hypotheses about affected tissues, the effect of gender and species, *etc*.

In vitro *PK models*

Linking intracellular concentrations of the active chemical species to effects should be the primary goal of *in vitro* assays, at least if predictions of *in vivo* effects are sought. Measuring those concentrations is clearly a prerequisite, but *in vitro* PK models able to smooth, interpolate and extrapolate such data are also needed [41]. That is the case, for example, when effects and concentrations are not measured at the same times, or if only a few doses have been tried, or in the presence of significant variability between *in vitro* experiments. There are several examples of models describing the fate of a chemical in a cell based assay [38,42,43]. Partitioning between cells, vial walls, culture medium (including binding on proteins and lipids), intra-cellular metabolism, *etc.* need to be accounted for when needed (Figure 3). In some cases, cell dynamics also needs to be modeled, for example if the number of cells or metabolic clearance change with time or treatment dose during the assay [44].

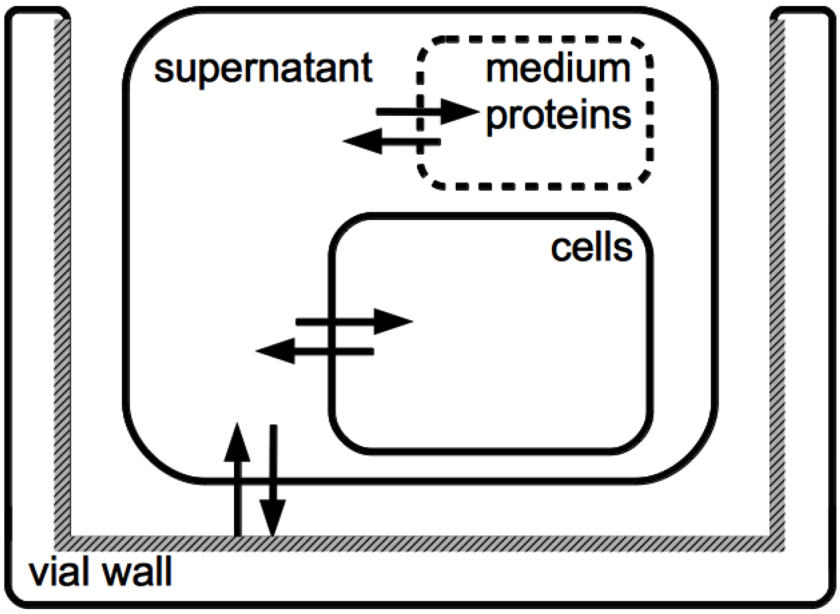


Figure 3: Conceptual *in vitro* PK model. The arrows represent exchanges between compartments (which are not necessarily physical volumes). The details of the corresponding mathematical model depend on the assay system, on the substance studied and on degree of knowledge about the mechanisms involved. There may also be for example metabolism in cells, evaporation, or degradation in the medium (not figured). Ideally all processes should be precisely measured to be able to establish a mass balance for the substance of interest.

3. Extrapolating Pharmacodynamics

When assessing the effect a compound could have on the physiological integrity (PD), the easiest and sometimes cheapest tools are *in vitro* experimentations. One additional advantage of these experimentations is that they permit in-depth investigations of cellular and molecular mechanisms. However, they do not exactly reflect the *in vivo* situation. For example, the body strives for homeostasis, and its many controls and regulations, involving several tissues and organs at different times, are impossible to strictly reproduce (at least exhaustively) in an *in vitro* system.

As for PK, a solution to extrapolate PD from *in vitro* biological targets to a whole body *in vivo* is to develop integrative computational models. These models can be either very simple, like statistical

dose-response models, or sophisticated and based on systems biology, according to the goal pursued and the data available.

Simple dose-response models

A basic tenet of current practice is to assume that the same cellular exposure concentration leads to the same effects, both qualitatively and quantitatively, *in vitro* and *in vivo*. That may be approximately correct for small and early effects, or for effects for which inter-cellular communications do not take part. In that case, it is enough to (*i.*) develop a simple PD model of the dose-response relationship observed *in vitro* and (*ii.*) transpose it without changes to predict *in vivo* effects, with an *in vivo* input concentration profile reconstructed using a PBPK model, as mentioned above. Louisse et al. [45] used that approach to predict *in vivo* dose-response curves for developmental toxicity. The embryotoxicity of four glycol ethers metabolites were tested *in vitro*. The concentration-response curves obtained were then used in conjunction with a PBPK model to reconstruct and predict the *in vivo* dose-response curves for the developmental toxicity of the parent glycol ethers to rats and humans. A good agreement was found in rats, for this endpoint and those substances, between the dose-response curves predicted and the embryotoxic dose levels reported in classical *in vivo* studies.

Systems biology models

Cells in cultures do not mimic perfectly cells in tissues *in situ*. To solve that extrapolation problem we can here also supplement statistical models with mechanistic information, or better, to rely on mechanistic systems biology models of the cell response. Those models are characterized by a hierarchical structure, ranging from molecular pathways, organelle function, whole cell response, cell to cell communications, tissue response, up to inter-tissue communications [4]. Isolated pathways cannot really be used for data analyses or predictive purposes, since they must be embedded in cells to be functional. At the organelle level, mitochondrial function has been the focus of several respiratory chain and oxidative stress models [46,47]. Work on other organelles is expanding to tackle cellular trafficking [48] or permeability mechanisms [49] for example.

However, most of the systems biology models address the cellular level directly, with only a few cellular processes described, such as glutathione synthesis [50] or oxidative stress response by the NFE2L2 (also named Nrf2) pathway [51]. The higher level corresponds to tissues, organs, and ultimately the entire body, defined as the physiome level for modelling purposes [52]. The liver, in particular, has attracted much interest in predictive toxicology [53,54]. The advantage of this kind of models is that then can be coupled to PBPK models and can integrate pathway models. One can actually view PBPK models as vascular system models, augmented with inputs and outputs for specific substances.

For local and early responses, understanding only the first three levels (molecular pathways, organelle function, and whole cell response) may be sufficient, and *in vitro* data, in particular omics data, address mostly those levels. There is, however, a hierarchy in the predictive capacity of *in vitro* data, according to the mechanisms by which the substance of interest interacts with molecular or cellular components: a direct physical effect on an enzyme (as measured for example by the 50% inhibiting concentration), is more likely to occur at the same concentrations *in vitro* and *in vivo* than an indirect activation due to gene induction (measured by an mRNA fold-changes) [55]. According to the type of *in vitro* data to integrate in the modelling process, several strategies can be followed. A recent article [56] describes the calibration of a computational model of the endocrine perturbation of steroidogenesis at the cellular level with *in vitro* data, and the extension of that model to describe the female rat ovarian cycle *in vivo* by just changing its inputs and boundary conditions. In any case, the huge advantage of systems biology models is that, once developed and validated, they are generic and only a small fraction of their parameters, characterizing the interaction between the substance(s) or interest and the cellular machinery, need to be calibrated when a new substance is investigated.

The variability question

We mentioned above that human variability in PK can be measured *in vitro*, for example by using cells from various donors, or simulated by Monte Carlo techniques with PBPK models. We face the same issues for PD or toxicity response. The problem is somewhat more acute here, because as long as we do not have well established mechanistic models of toxicity it will be difficult to translate a

variability measured at a cellular level into a variability expected *in vivo*. The integrated body system can either dampen or amplify cellular response variability. Nevertheless, at the experimental level, human cell lines (*e.g.*, induced pluripotent stem cells) obtained from genetically diverse subjects and multiple populations should be able to provide us with data for assessing the variability of toxic response, see [57] for a review. The challenge is also to relate that variability to the genetic, epigenetic or phenotypic characteristics of those cells, for a mechanistic understanding of the causes of increased susceptibility in some individuals.

4. Addressing the PK/PD Continuum

PK and PD form a continuum and the boundary between them is in fact arbitrary. Where does metabolism (PK?) stop and where does interaction with cellular constituents (PD?) start? Furthermore, their relationship is not simple and linear. They may interact with each other in complex ways. It is obvious that PK condition PD through target dose. We mentioned above the routine input of target concentration (as given by PBPK models, for example) to PD models in order to better describe the relationship between external exposure and subsequent effects. On the contrary, the retro-action of PD on PK is rarely taken into account. Arguably, such an effect is likely to occur after some latency, and late in the development of toxicity. Is that a good reason to forget about it? As predictions aim to be increasingly integrated, and deals more and more with chronic exposures and diseases (notably for developmental or multi-generational effects, carcinogenesis *etc.*), it appears fundamental to fully address the PK/PD continuum up to disease models [58].

For example, the induction of metabolising enzymes by a chemical can greatly modify its PK and that of other substances, which is the subject of metabolic interactions [59]. Intestinal barrier alterations due to intestinal toxicity can also affect PK [3]. Toxicity induced retro-action mechanisms can also increase volumes of distribution: The interaction of a chemical with aromatase can lead to a decrease in estradiol production, hence a decrease in FSH secretion, followed by a decrease in follicular growth and a reduction of the ovary volume [56]. This should have implications for the design of *in vitro* assays systems. Integrated systems, such as those coupling

metabolism and effect observations in "human on chip" micro-devices [5], offer a way to model experimentally the PK/PD continuum.

We have recently shown how a PBPK model can be used to impose realistic boundary conditions to a cellular systems biology (SB) model [50]. As we progress toward the integration of PK and pathway modelling, we suggest that we should stop thinking of PBPK models as addressing the whole "ADME" continuum, and start confining them to the "ADE" components only. Dealing with the full extent and depth of metabolism within PBPK models will just duplicate systems biology research, and should be left in that playing field. The work of Krauss *et al.* [60] also illustrates the use of a multi-scale dynamic models to investigate effect mechanisms. In their approach, they integrate multiple layers of biological organization, from a metabolic networks at the cellular scale to a PBPK model at the whole-body level, and perform an iterative dynamic flux balance analysis. Although it is somewhat decoupled, that approach gives an integrated view of metabolic capacity and perturbation. Obviously, there is still a need to interface ADE PBPK models with systems biology metabolism and toxicity pathway models. The *GNU MCSim* software [61], can take generic ADE equations and automatically couple them to (SBML coded) metabolic pathway descriptions for any species of interest, in any organ or tissue [33]. The resulting linked models are, by construction, able to account for feedback effects of homeostasis maintenance and early toxicity effects on PK (*e.g.*, via enzymatic of transport induction, *etc.*) The question of variability and uncertainty propagation is compounded in linked PBPK-PD models. Decoupling approaches [62,63] will be unlikely to work properly in that case. In principle, Monte Carlo based numerical methods [64] should still work, but the computational burden will be likely to increase.

5. Further Challenges

Analytical chemistry

All the above layers of experiments and modelling rely on quantitative measurements of the parent compounds and active metabolites concentrations at the cell level (at least) *in vitro*. Mass balance should be checked also, to be able to correctly model and extrapolate cell entry, exit and

metabolism. So it is important to develop analytical methods to measure free concentrations in the medium, cellular concentrations and quantity bound to the vial walls or medium proteins over time. Automation and analytical methods such as liquid chromatography with tandem mass spectroscopy (LC/MS/MS) have vastly increased the sample throughput for *in vitro* ADME assays [65], and the same should hold for *in vitro* toxicity assessment [66]. Metabolomic data might be an answer to that question, but keeping in mind that enough time points have to be available to reconstruct concentrations *vs*. time curves. Sampling also should strive to be non-destructive: Destructive sampling forbids multiple sampling of the same experimental unit at different times, which is vastly preferable when assessing the kinetics of ADME or effects. Analytical methods face a further challenge of sensitivity and specificity arising from the ever decreasing volumes of the samples collected. All the above should also be considered when designing advanced (*e.g.*, miniaturized or three-dimensional) cell culture and assay systems.

Increasingly complex data

In vivo prediction can be significantly improved with *in vitro* assays systems designed to better mimic tissues and organs. For example, when assessing the effects of chemicals on steroidogenic enzymes, the *in vitro* medium should be supplemented with relevant concentrations of hormones controlling the function and expression of those enzymes [55]. For the same reason, co-culture *in vitro* models should be more pertinent [67]. Recent developments on microfluidic bioreactors coupled with cell cultures techniques have led to the development of "human on chip" systems [5] that can be seen as miniaturized (and much simplified) bodies or analogical PBPK models [1]. For example, a four-chamber microscale cell culture system has been used to study the role of the naphthalene metabolism in its toxicity and bioaccumulation using cultures of L2 cells for the lung compartment, HepG2/C3A cells for the liver, and differentiated 3T3-L1 adipocytes for the fat [68,69]. In a similar system, Tatosian and Shuler [70] studied the combined effect of several anticancer drugs, using HepG2/C3A as liver cells, MEG-01 as bone narrow cells, MES-SA as uterine cancer cells, and MES-SA/DX-5 as a multidrug resistant variant of uterine cancer. With the help of a PBPK model, they were able to scale-up the *in vitro* results to calculate doses for *in vivo*

trials. Such approaches increase the relevance of *in vitro* systems for *in vivo* predictions, but bring about the problem of data over-abundance.

Omics analyses also bring us increasingly complex data, and in massive amounts. The statistical and computational tools to integrate such data are currently lagging behind the technological advances able to produce them. A typical challenge we face here is the "curse of dimensionality": the difficulty and time required to finding a solution, related to the actual size of the problem, increases exponentially with the amount of data we have. Exponentials are no laughing matter in computational complexity. For example, the number of regulatory networks possible with 3 genes is 23 times 3, so 512. With 4 genes we are up to 65536 possible configurations; 5 genes yields more than 33 millions solutions, and so forth. Assume that a computer takes nanosecond to a find the best solution for 3 genes, it will need 20 minutes for 7 genes, a year for 8 genes, and 150,000 years for 9 genes! Complete genomes have of the order of 1000 or 10000 genes... The solution is not simply faster computers. It requires clever algorithms and deeper mathematical methods that can cut through the thicket of solutions.

Model complexity

At this moment we do not have a unified or simply satisfying set of tools for dealing with the complexity of the living organisms and the data we gather on them (except maybe in procaryotes). On one hand, to uncover associations between genes, proteins, metabolites *etc*. we have statistical models (Gaussian graphical models, for example) [71] able to analyse large omics data, but unusable for quantitative predictions. On the other hand, we have very precise bottom-up systems biology models, encoded in differential equations and well suited for quantitative predictions [72], but they address only a tiny fraction of the cell global network (typically less than a percent) and are very heavy to develop. And on yet another hand we have virtual human projects attempting to follow a top-down approach, but for which omics data integration is problematic [73]. We do not know yet either which are the best modelling techniques for predictive purposes, or the best modelling strategy to adopt. An identified need is a common language for specifying or describing the various models. Solution to that question is under way with the development of standard ontologies and languages, such as the Systems Biology Markup Language (SBML) [74]. There is

also a need for hybrid or unifying methods, able to describe precise mechanisms when they are known, but link them to fuzzier descriptions [75,76].

Obviously, it is impossible to develop a model that would reflect all the body complexity. The best solution is probably to identify the potential toxicity targets or mechanisms of a chemical (*e.g.*, *via* QSAR models or omics signatures), and then to develop a focused mechanistic model.

6. Conclusion

Ensuring the predictivity of *in vitro* assays has two main implications. First, for a foreseeable future, interactions between biologists and statisticians or mathematicians will be needed to design decision oriented experiments and models. This supposes a common language and some exposure of the practitioners in each fields to the concepts and methods of the others. Training, starting at the university level for example, is important to that effect.

Second, in terms of experimental design, concentration data for PK should be systematically collected. That may not seem terribly exciting but forms the basis for correct extrapolation. Those data should be analysed with pharmacokinetic models to quantify the *in vitro* PK and transpose it (using well developed PBPK concepts) to the whole body. To relate cellular levels to effects, empirical (statistical) dose-response models can be used, but systems biology models are probably more interesting and fruitful in the long run.

7. References

1. Sung JH, Esch MB, Shuler ML (2010) Integration of *in silico* and *in vitro* platforms for pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 6:1063-1081
2. Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen K, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard T, Casati S, Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G, Dekant W, Felter S, Grignard E, Gundert-Remy U, Heinonen T, Kimber I, Kleinjans J, Komulainen H,

Kreiling R, Kreysa J, Leite S, Loizou G, Maxwell G, Mazzatorta P, Munn S, Pfuhler S, Phrakonkham P, Piersma A, Poth A, Prieto P, Repetto G, Rogiers V, Schoeters G, Schwarz M, Serafimova R, Tähti H, Testai E, van Delft J, van Loveren H, Vinken M, Worth A, Zaldivar J-M (2011) Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects - 2010. Archives of Toxicology 85 (5):367-485. doi:10.1007/s00204-011-0693-2

3. Yoon M, Campbell JL, Andersen ME, Clewell HJ (2012) Quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation of cell-based toxicity assay results. Critical Reviews in Toxicology doi: 10.3109/10408444.2012.692115
4. Hunt CA, Ropella GE, Lam TN, Tang J, Kim SH, Engelberg JA, Sheikh-Bahaei S (2009) At the biological modeling and simulation frontier. Pharmaceutical Research 26:2369-2400
5. El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF (2006) Cells on chips. Nature 442:403–411
6. Maguire TJ, Novik E, Chao P, Cheng K-C (2009) Design and application of microfluidic systems for *in vitro* pharmacokinetic evaluation of drug candidates. Current Drug Metabolism 10:1192-1199
7. Buchanan JR, Burka LT, Melnick RL (1997) Purpose and guidelines for toxicokinetic studies within the National Toxicology Program. Environmental Health Perspectives 105:468-471
8. Gülden M, Mörchel S, Seibert H (2001) Factors influencing nominal effective concentrations of chemical compounds in vitro: cell concentration. Toxicology in Vitro 15:233-243
9. Seibert H, Mörchel S, Gülden M (2002) Factors influencing nominal effective concentrations of chemical compounds in vitro: medium protein concentration. Toxicology in Vitro 16:289-297
10. Coecke S, Pelkonen O, Batista Leite S, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Gundert-Remy U, Loizou G, Testai E, Zaldívar JM (2012) Toxicokinetics as a key to the integrated toxicity risk assessment based primarily on non-animal approaches. Toxicology in Vitro. doi:12. 10.1016/j.tiv.2012.06.012
11. Wetmore BA, Wambaugh JF, Ferguson SS, Li L, Clewell HJ, III, Judson RS, Freeman K, Bao W, Sochaski MA, Chu TM, Black MB, Healy E, Allen B, Andersen ME, Wolfinger RD, Thomas RS (2013) Relative impact of incorporating pharmacokinetics on predicting *in vivo* hazard and mode of action from high-throughput *in vitro* toxicity assays. Toxicological Sciences 132:327-346. doi:10.1093/toxsci/kft012

12. Hamon J, Perez Schönberg T, Bois FY (in press) Physiologically-based pharmacokinetic modeling. In: Ruiz-Garcia A, Casabo VG (eds) Pharmacokinetics: Concepts and Applications in Drug Discovery and Development. John Wiley & sons, Hoboken,
13. Rowland M, Peck C, Tucker G (2011) Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 51:45-73
14. Jamei M, Marciniak S, Feng KR, Barnett A, Tucker G, Rostami-Hodjegan A (2009) The Simcyp population-based ADME simulator. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 5:211-223
15. Beaudouin R, Micallef S, Brochot C (2010) A stochastic whole-body physiologically based pharmacokinetic model to assess the impact of inter-individual variability on tissue dosimetry over the human lifespan. Regulatory Toxicology and Pharmacology 57:103-116
16. Eissing T, Kuepfer L, Becker C, Block M, Coboeken K, Gaub T, Goerlitz L, Jaeger J, Loosen R, Ludewig B, Meyer M, Niederalt C, Sevestre M, Siegmund H-U, Solodenko J, Thelen K, Telle U, Weiss W, Wendl T, Willmann S, Lippert J (2011) A computational systems biology software platform for multiscale modeling and simulation: integrating whole-body physiology, disease biology, and molecular reaction networks. Frontiers in Physiology 2:1-10. doi:10.3389/fphys.2011.00004
17. Campbell JL, Jr., Clewell RA, Gentry PR, Andersen ME, Clewell HJ, III (2012) Physiologically based pharmacokinetic/toxicokinetic modeling. In: Reisfeld B, Mayeno AN (eds) Computational Toxicology, Methods in Molecular Biology Series. Methods in Molecular Biology, n° 929. Humana Press, New-York, pp 439-499, doi: 410.1007/1978-1001-62703-62050-62702_62718
18. International Commission on Radiological Protection (ICRP) (2002) Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. ICRP Publication 89. Annals of the ICRP 32(3/4)
19. Bois FY, Jamei M, Clewell HJ (2010) PBPK modelling of inter-individual variability in the pharmacokinetics of environmental chemicals. Toxicology 278:256–267
20. Bosgra S, van Eijkeren J, Bos P, Zeilmaker M, Slob W (2012) An improved model to predict physiologically based model parameters and their inter-individual variability from

anthropometry. Critical Reviews in Toxicology 42:751-767. doi:10.3109/10408444.2012.709225

21. Fiserova-Bergerova V, Diaz ML (1986) Determination and prediction of tissue-gas partition coefficients. International Archives of Occupational and Environmental Health 58:75-87
22. Poulin P, Ekins S, Theil FP (2011) A hybrid approach to advancing quantitative prediction of tissue distribution of basic drugs in human. Toxicology and Applied Pharmacology 250:194-212
23. Buch I, Giorgino T, De Fabritiis G (2011) Complete reconstruction of an enzyme-inhibitor binding process by molecular dynamics simulations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 108 (25)
24. Hu T, Khambatta ZS, Hayden PJ, Bolmarcich J, Binder RL, Robinson MK, Carr GJ, Tiesman JP, Jarrold BB, Osborne R, Reichling TD, Nemeth ST, Aardema MJ (2010) Xenobiotic metabolism gene expression in the EpiDermin vitro 3D human epidermis model compared to human skin. Toxicology in Vitro 24:1450-1463. doi:10.1016/j.tiv.2010.03.013
25. Basak S, Mills D, Mumtaz M (2007) A quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of dermal absorption using theoretical molecular descriptors. SAR and QSAR in Environmental Reasearch 18:45–55
26. Mitragotri S, Anissimov YG, Bunge AL, Frasch HF, Guy RH, Hadgraft J, Kasting GB, Lane ME, Roberts MS (2011) Mathematical models of skin permeability: an overview. International Journal of Pharmaceutics 418:115-129. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.023
27. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE (2010) Reconstituting organ-level lung functions on a chip. Science 328 (5986):1662-1668
28. Thompson MD, Beard DA, Wu F (2012) Use of partition coefficients in flow-limited physiologically-based pharmacokinetic modeling. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 39:313-327. doi:10.1007/s10928-012-9252-6
29. Lai Y, Varma M, Feng B, Stephens JC, Kimoto E, El-Kattan A, Ichikawa K, Kikkawa H, Ono C, Suzuki A, Suzuki M, Yamamoto Y, Tremaine L (2012) Impact of drug transporter pharmacogenomics on pharmacokinetic and pharmacodynamic variability - considerations for drug development. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 8:723-743. doi:10.1517/17425255.2012.678048

30. Waters NJ, Jones R, Williams G, Sohal B (2008) Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. Journal of Pharmaceutical Sciences 97:4586–4595

31. Zhang J, Musson DG (2006) Investigation of high-throughput ultrafiltration for the determination of an unbound compound in human plasma using liquid chromatography and tandem mass spectrometry with electrospray ionization. Journal of Chromatography B 843:47–56]

32. Nakai D, Kumamoto K, Sakikawa C, Kosaka T, Tokui T (2004) Evaluation of protein binding ratio of drugs by a micro-scale uktracentrifugation method. Journal of Pharmaceutical Sciences 93:847–851

33. Bois FY (2009) Physiologically-based modelling and prediction of drug interactions. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 106:154-161

34. Burt H, Neuhoff S, Lu G, Jamei M, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A (2012) Simulation of the effect of urine pH on renal drug clearance using a novel population based mechanistic kidney model (Mech KiM). Paper presented at the Gordon Research Conference – Drug Metabolism, 8th-13th July, 2012, Holderness NH, USA,

35. Yang X, Gandhi YA, Duignan DB, Morris ME (2009) Prediction of biliary excretion in rats and humans using molecular weight and quantitative structure-pharmacokinetic relationships. The AAPS Journal 11:511-525. doi:10.1208/s12248-009-9124-1

36. De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, Keemink J, Nicolai J, Augustijns P, Annaert P (2013) Sandwich-cultured hepatocytes: utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 9:589-616. doi:10.1517/17425255.2013.773973

37. Bois FY, Jamei M (2012) Population-based pharmacokinetic modeling and simulation. In: Lyubimov AV (ed) Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions, vol XI. John Wiley & sons, Hoboken, pp 1-27. doi:10.1002/9780470921920.edm135

38. Yang Y, Himmelstein MW, Clewell HJ (2012) Kinetic modeling of β-chloroprene metabolism: probabilistic *in vitro-in vivo* extrapolation of metabolism in the lung, liver and kidneys of mice, rats and humans. Toxicology in Vitro (6):1047-1055

39. Gelman A, Bois FY, Jiang J (1996) Physiological pharmacokinetic analysis using population modeling and informative prior distributions. Journal of the American Statistical Association 91:1400-1412

40. Himmelstein MW, Carpenter SC, Evans MV, Hinderliter PM, Kenyon EM (2004) Kinetic modeling of beta-chloroprene metabolism: II. The application of physiologically based modeling for cancer dose response analysis. Toxicological Sciences 79:28–37

41. Blaauboer BJ (2010) Biokinetic modeling and *in vitro* - *in vivo* extrapolations. Journal of Toxicology and Environmental Health Part B 13:242–252

42. Ouattara DA, Choi SH, Sakai Y, Pery AR, Brochot C (2011) Kinetic modelling of *in vitro* cell-based assays to characterize non-specific bindings and ADME processes in a static and a perfused fluidic system. Toxicology Letters 205:310-309. doi:10.1016/j.toxlet.2011.06.021

43. Wilmes A, Limonciel A, Aschauer L, Moenks K, Bielow C, Leonard MO, Hamon J, Carpi D, Ruzek S, Handler A, Schmal O, Herrgen K, Bellwon P, Burek C, Truisi GL, Hewitt P, Di Consiglio E, Testai E, Blaauboer BJ, Guillou C, Huber CG, Lukas A, Pfaller W, Mueller SO, Bois FY, Dekant W, Jennings P (2013) Integrated omic profiling reveals novel insights of cyclosporine A induced cellular stress. Journal of Proteomics 79:180-194. doi:10.1016/j.jprot.2012.11.022

44. Anthérieu S, Chesné C, Li R, Camus S, Lahoz A, Picazo L, Turpeinen M, Tolonen A, Uusitalo J, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2010) Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. Drug Metabolism and Disposition 38:516–525

45. Louisse J, de Jong E, van de Sandt JJ, Blaauboer BJ, Woutersen RA, Piersma AH, Rietjens IM, Verwei M (2010) The use of in vitro toxicity data and physiologically based kinetic modeling to predict dose-response curves for in vivo developmental toxicity of glycol ethers in rat and man. Toxicological Sciences 118:470-484. doi:10.1093/toxsci/kfq270

46. Selivanov VA, Votyakova TV, Pivtoraiko VN, Zeak J, Sukhomlin T, Trucco M, Roca J, Cascante M (2011) Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. Plos Computational Biology 7:e1001115

47. Yugi K, Tomita M (2004) A general computational model of mitochondrial metabolism in a whole organelle scale. Bioinformatics 20:1795-1796. doi:10.1093/bioinformatics/bth125

48. Begley TJ, Rosenbach AS, Ideker T, Samson LD (2004) Hot spots for modulating toxicity identified by genomic phenotyping and localization mapping. Molecular Cell 16 (1):117-125. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.005

49. Quignot N (2013) Modeling bioavailability to organs protected by biological barriers. In Silico Pharmacology 1 (8). doi:10.1186/2193-9616-1-8

50. Geenen S, Yates JW, Kenna JG, Bois FY, Wilson ID, Westerhoff HV (2013) Multiscale modelling approach combining a kinetic model of glutathione metabolism with PBPK models of paracetamol and the potential glutathione-depletion biomarkers ophthalmic acid and 5-oxoproline in humans and rats. Integrative Biology 5:877-888

51. Zhang Q, Andersen M (2007) Dose response relationship in anti-stress gene regulatory networks. Plos Computational Biology 3:e24. doi:10.1371/journal.pcbi.0030024.eor

52. Moore MN, Noble D (2004) Computational modelling of cell and tissue processes and function. Journal of molecular histology 35:655-658. doi:10.1007/s10735-004-2653-0

53. Yan L, Sheihk-Bahaei S, Park S, Ropella GEP, Hunt CA (2008) Predictions of hepatic disposition properties using a mechanistically realistic, physiologically based model. Drug Metabolism and Disposition 36 (4):759-768

54. Kavlock RJ, Ankley G, Blancato J, Breen M, Conolly R, Dix D, Houck K, Hubal E, Judson R, Rabinowitz J, Richard A, Setzer RW, Shah I, Villeneuve D, Weber E (2008) Computational toxicology - A state of the science mini review. Toxicological Sciences 103 (1):14-27

55. Quignot N, Desmots S, Barouki R, Lemazurier E (2012) A comparison of two human cell lines and two rat gonadal cell primary cultures as in vitro screening tools for aromatase modulation. Toxicology in Vitro 26 (1):107-118. doi:10.1016/j.tiv.2011.11.004

56. Quignot N, Bois FY (2013) A computational model to predict rat ovarian steroid secretion from in vitro experiments with endocrine disruptors. Plos One 8:e53891. doi:10.1371/journal.pone.0053891

57. Zeise L, Bois FY, Chiu WA, Hattis D, Rusyn I, Guyton KZ (2013) Addressing human variability in next-generation human health risk assessments of environmental chemicals. Environmental Health Perspectives 121:23–31. doi:10.1289/ehp.1205687

58. Punt A, Schiffelers MJ, Jean Horbach G, van de Sandt JJ, Groothuis GM, Rietjens IM, Blaauboer BJ (2011) Evaluation of research activities and research needs to increase the impact

and applicability of alternative testing strategies in risk assessment practice. Regulatory Toxicology and Pharmacology 61:105-114. doi:10.1016/j.yrtph.2011.06.007

59. Dorne JL (2010) Metabolism, variability and risk assessment. Toxicology 268:156-164. doi:10.1016/j.tox.2009.11.004

60. Krauss M, Schaller S, Borchers S, Findeisen R, Lippert J, Kuepfer L (2012) Integrating cellular metabolism into a multiscale whole-body model. Plos Computational Biology 8:13. doi:10.1371/journal.pcbi.1002750

61. Bois FY (2009) GNU MCSim: Bayesian statistical inference for SBML-coded systems biology models. Bioinformatics 25:1453-1454

62. Bennett J, Wakefield J (2001) Errors-in-variables in joint population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. Biometrics 57:803-812

63. Lunn D, Best N, Spiegelhalter D, Graham G, Neuenschwander B (2009) Combining MCMC with 'sequential' PKPD modelling. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 36:19-38

64. Bernillon P, Bois FY (2000) Statistical issues in toxicokinetic modeling: a Bayesian perspective. Environmental Health Perspectives 108 (suppl. 5):883-893

65. van de Waterbeemd H (2002) High-throughput and in silico technique in drug metabolism and PK. Current Opinions in Drug Discovery and Development 5:33-43

66. Quignot N, Tournier M, Pouech C, Cren-Olive C, Barouki R, Lemazurier E (2012) Quantification of steroids and endocrine disrupting chemicals in rat ovaries by LC-MS/MS for reproductive toxicology assessment. Analytical and Bioanalytical Chemistry 403:1629-1640. doi:10.1007/s00216-012-5990-y

67. Mishra J, Gautam M, Dadhich R, Kowtharapu BS, Majumdar SS (2012) Peritubular cells may modulate Leydig cell-mediated testosterone production through a nonclassic pathway. Fertility and Sterility 98:1308-1317 e1301. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.07.1124

68. Viravaidya K, Shuler ML (2004) Incorporation of 3T3-L1 cells to mimic bioaccumulation in a microscale cell culture analog device for toxicity studies. Biotechnology Progress 20:590-597. doi:10.1021/bp034238d

69. Viravaidya K, Sin A, Shuler ML (2004) Development of a microscale cell culture analog to probe naphtalene toxicity. Biotechnology Progress 20:316–323

70. Tatosian DA, Shuler ML (2009) A novel system for evaluation of drug mixtures for potential efficacy in treating multidrug resistant cancers. Biotechnology Bioengineering 103:187-198

71. Krumsiek J, Suhre K, Illig T, Adamski J, Theis FJ (2011) Gaussian graphical modeling reconstructs pathway reactions from high-throughput metabolomics data. BMC Systems Biology 5:21. doi:10.1186/1752-0509-5-21

72. Geenen S, Taylor PN, Snoep JL, Wilson ID, Kenna JG, Westerhoff HV (2012) Systems biology tools for toxicology. Archives of Toxicology 86:1251-1271

73. Beard DA, Neal ML, Tabesh-Saleki N, Thompson CT, Bassingtwaighte JB, Shimoyama M, Carlson BE (2011) Multiscale modeling and data integration in the virtual physiological rat project. Annals of Biomedical Engineering 40 (11):2365-2378. doi:10./s10439-012-0611-7

74. Hucka M, Finney A, Sauro HM, Bolouri H, Doyle JC, Kitano H, Arkin AP, Bornstein BJ, Bray D, Cornish-Bowden A, Cuellar AA, Dronov S, Gilles ED, Ginkel M, Gor V, Goryanin I, Hedley WJ, Hodgman TC, Hofmeyr JH, Hunter PJ, Juty NS, Kasberger JL, Kremling A, Kummer U, Le Novere N, Loew LM, Lucio D, Mendes P, Minch E, Mjolsness ED, Nakayama Y, Nelson MR, Nielsen PF, Sakurada T, Schaff JC, Shapiro BE, Shimizu TS, Spence HD, Stelling J, Takahashi K, Tomita M, Wagner J, Wang J (2003) The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. Bioinformatics 19:524-531

75. Li Z, Li P, Krishnan A, Liu JD (2011) Large-scale dynamic gene regulatory network inference combining differential equation models with local dynamic Bayesian network analysis. Bioinformatics 27:2686-2691. doi:10.1093/bioinformatics/btr454

76. Ocone A, Millar AJ, Sanguinetti G (2013) Hybrid regulatory models: a statistically tractable approach to model regulatory network dynamics. Bioinformatics 29:910-916. doi:10.1093/bioinformatics/btt06.